HERPESUL

ACAD. ȘT. S. NICOLAU ȘI N. DRĂGĂNESCU

HERPESUL

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII SOCIALISTE ROMÂNIA
1968

Scanned with OKEN Scanner

TABLA DE MATERII

Pag.

Prefaţă 7

Noţiuni generale asupra virusurilor herpetice 9
Bibliografie 10

VIRUSUL HERPETIC SIMPLEX

Istoric 11
Bibliografie 13

Capitolul 1 — AGENTUL PATOGEN

Structură şi compoziţie 15
Bibliografie 48
Proprietăţile virusului herpetic 49
Acţiunea agenţilor fizici asupra virusului 55
Acţiunea agenţilor chimici şi biologici asupra virusului 57
Bibliografie 62
Cultivarea virusului 65
A. Cultivare în oul de găină embrionat . . . 65
B. Cultivare în oul de raţă embrionat . . . 67
C. Cultivare în tumori animale 67
D. Cultivare în culturi celulare 67
Multiplicarea virusului 78
Tulpini de virus 94
Bibliografie 113

Capitolul 2 — INFECŢIA EXPERIMENTALĂ

Herpesul experimental la animal 119
A. Inocularea la animalele de experienţă . . 119
B. Repartiţia virusului în ţesuturi şi umori . 137
C. Căile de eliminare a virusului din organism 140
D. Căile de migrare a virusului în organism . 141
Herpesul experimental la om 152
Bibliografie 154

Capitolul 3 — INFECŢIA NATURALĂ

Epidemiologie 159
Boala la om 163
A. Infecţii herpetice ale tegumentelor . . . 165
B. Infecţii herpetice ale mucoaselor 170
C. Determinări nervoase în infecţia herpetică 176
D. Infecţia herpetică neonatală 181
E. Herpesul recidivant 183
Bibliografie 189

Capitolul 4 — ANATOMIE PATOLOGICĂ

A. Leziuni în infecţia experimentală 195
B. Leziuni în infecţia herpetică umană . . . 210
C. Incluziile herpetice 216
Bibliografie 222

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5 — PROFILAXIE ŞI TRATAMENT Pag.

Bibliografie 237

Capitolul 6 — IMUNITATE ŞI PARAIMUNITATE

Imunitate tisulară 241
A. Imunitatea antiherpetică la animal . . . 241
B. Imunitatea antiherpetică la om 252
Imunitate umorală 252
Paraimunitate 257
Bibliografie 267

Capitolul 7 — RELAŢII CU ALTE VIRUSURI

Bibliografie 280

Capitolul 8 — DIAGNOSTIC

Diagnosticul orientativ 283
Diagnosticul de certitudine 285
A. Izolarea virusului 285
B. Identificarea virusului 290
Diagnosticul serologic al bolii 304
A. Reacţia de precipitare. 304
B. Reacţia de seroneutralizare 305
C. Reacţia de fixare a complementului . . . 314
D. Hemadsorbţia mixtă 328
E. Testul de hipersensibilitate cutanată . . . 329
Bibliografie 333

VIRUSUL HERPETIC B

A. Virusul 340
B. Variante de virus 347
C. Relaţii antigenice cu alte virusuri 348
D. Infecţia experimentală 348
E. Epidemiologie 349
F. Boala naturală la maimuţă 349
G. Boala la om 351
H. Propagarea infecţiei. 352
I. Anatomie patologică 352
J. Profilaxie şi tratament 353
K. Diagnostic 354
Bibliografie 355

VIRUSURI INCLUSE PROVIZORIU ÎN GRUPUL HERPETIC

Virusul herpetic al marmosetei 357
Virusul rinopneumonitei ecvine 360
Virusul rinotraheitei infecţioase a bovinelor 363
Virusul laringotraheitei infecţioase aviare 366
Virusul III al iepurelui 368
Bibliografie 368

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

A scrie o prefață presupune, de obicei, un act mult mai dificil decît poate părea la prima vedere, bineînțeles, dacă intenția celui ce-și asumă o asemenea răspundere nu se reduce la alcătuirea unei prezentări mai mult sau mai puțin formale, ci se prelungește în încercarea de a dărui cititorului o oglindă succintă a spiritului cărții pe care o deschide și un profil cît mai precis al celui sau al celor care au creat-o.

Dincolo de aceste probleme, care se pun în cazul oricărei prezentări, prefațarea monografiei „HERPESUL" de Acad. Șt. S. Nicolau și dr. N. Drăgănescu așează pe umerii noștri o sarcină mult mai complexă și mai grea. Ceea ce am dori și ceea ce trebuie să spunem despre volumul de față nu poate fi rostit decît pe fondul unei profunde emoții, întrucît acestea sînt primele pagini care poartă semnătura postumă a iubitului și regretatului nostru maestru. S-ar cuveni, poate, să accentuăm aici principalele coordonate și caracteristici ale marelui spirit științific care a fost Ștefan S. Nicolau. Dar o asemenea încercare ar depăși, fără îndoială, granițele prezentării unei cărți, confundîndu-se cu dorința de a cuprinde cît mai mult lumina exemplară a unei vieți și a unei opere științifice de o bogăție puțin obișnuită. Pe de altă parte, sîntem convinși că ochiul atent al cititorului va recunoaște cu ușurință în paginile înseși ale cărții rigoarea gîndirii și a exprimării, multitudinea și mobilitatea, pe cît de vie, pe atît de disciplinată a ideilor, limpezimea coordonării și a ierarhizării unei vaste și adînci documentații, ca și toate celelalte daruri ale spiritului științific întruchipat de Profesorul Nicolau.

De altfel, subiectul monografiei pe care cu emoție îndrăznesc să o prezint a constituit una din pasiunile sale, un domeniu pe care l-a urmărit cu un interes deosebit de la începutul carierei sale, domeniu în care inițial alături de maestrul său C. Levaditi și apoi singur sau cu elevii săi, a făcut descoperiri și a adus contribuții din care multe au devenit astăzi clasice. Mă

refer în primul rînd la lucrările privind proprietăţile virusului herpetic, fenomenul de septinevrită, incluziogeneza, imunitatea serică şi tisulară, fenomenul de paraimunitate etc. Dacă ţinem seama că în domeniul abordat şcoala română de inframicrobiologie, în frunte cu întemeietorul ei, a realizat 84 de lucrări originale ce alături de lucrările savanţilor români C. Levaditi, Ştefan Gh. Nicolau, S. Longhin etc. au stat la baza acestei monografii, se poate aprecia că ea constituie şi o foarte utilă operă de subliniere a contribuţiei româneşti în domeniul herpesului. Această latură permite o înţelegere în plus a valorii unei deosebit de reuşite sinteze a unui material vast, organizat şi bine prezentat, extrem de util nu numai celor interesaţi în mod special de infecţia herpetică, dar şi tuturor celor interesaţi ce doresc să se informeze asupra diverselor probleme de biologie inframicrobiană, virusul herpetic constituind un foarte fidel şi complet model experimental.

Iată de ce, prezentînd cititorului monografia „Herpesul", se cuvine ca alături de profunda şi pioasa admiraţie pentru opera regretatului meu maestru, alături de o respectuoasă evocare a luminoasei sale figuri, să aduc sincere felicitări celui de al doilea autor, iubitului său elev şi colaborator dr. Nicolae Drăgănescu, şeful sectorului de neurovirusuri din Institutul de Inframicrobiologie „Ştefan S. Nicolau". Sînt convins că monografia „Herpesul" se va înscrie printre succesele literaturii noastre ştiinţifice medico-biologice.

Prof. dr. doc. N. CAJAL
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R. S. ROMÂNIA
Directorul Institutului de Inframicrobiologie
„Ştefan S. Nicolau"

Aprilie 1968.

Scanned with OKEN Scanner

NOȚIUNI GENERALE ASUPRA VIRUSURILOR HERPETICE

În 1954, Comitetul nomenclaturii internaționale (2) include în același grup (grupul herpetic) virusurile herpetic *simplex* (herpes *hominis*), herpetic *B* (herpes *simiae*), *pseudorabic* (herpes *suis*), virusul *III* (herpes *cuniculi*) și *varicelă-zooster* (herpes *varicellae*).

Dintre aceste virusuri, cel herpetic *simplex*, herpetic *B* și *pseudorabic* s-au dovedit a avea relații antigenice (fixare a complementului și seroneutralizare). Ele sînt de formă sferică cu dimensii cuprinse între 100 și 200 m μ, au o simetrie cubică mai rar icosahedrică și o capsidă formată din 162 de capsomere (11) (9) (1). Sînt stabile la —70°C, sensibile la acțiunea eterului în concentrații de 20% și inactivate la temperatura de 56°C. Toate conțin ADN, se multiplică în nucleul celulei, cultivă în oul de găină embrionat după inoculări pe membrana corioalantoidă și în culturi celulare (celule primare și linii celulare) și determină apariția de incluzii intranucleare.

Treptat, au fost incluse în grupul herpetic, însă în mod provizoriu, virusurile: marmosetei, rinopneumonitei și catarului ecvin, laringotraheitei infecțioase bovine, laringo-traheitei aviare, rino-traheitei felinelor, virusul bolii lui Pacheco, al bolii bufniței, al bolii cu incluzii a papagalilor, al bolii cu incluzii citomegalice etc.

Caracteristice acestor virusuri sînt leziunile necrotice pe care le determină în organismele sensibile și prezența incluziilor în nucleul celulelor infectate. Ca și la virusul herpetic, unele din acestea au o simetrie axială cubică și o capsidă formată din 162 de capsomere (7) (8) (5) (4).

Dintre virusurile grupului herpetic, o importanță deosebită pentru om o au însă numai virusurile herpetic *simplex* (herpes *hominis*) și herpetic *B* (herpes *simiae*).

Ambele virusuri au preferință, însă nu exclusivă, față de gazda lor naturală (omul în cazul herpesului *simplex* și maimuța în cazul herpesului *simiae*) pentru țesuturile derivate din ectodermul embrionar, produc leziuni cutaneo-mucoase asemănătoare și determină apariția de incluzii intranucleare în celulele infectate.

Istoria naturală a virusului herpes *simplex* a fost lămurită o dată cu izolarea virusului din leziunile de stomatită aftoasă a copilului mic (6). Prin teste de seroneutralizare s-a demonstrat (3) că stomatita herpetică a această vîrstă nu este altceva decît o infecție herpetică primară.

Scanned with OKEN Scanner

Odată infecţia contractată, organismul rămîne adesea purtător de virus, deşi anticorpii specifici sînt prezenţi în sînge; virusul persistă în organismul respectiv sub formă „biofită" şi determină, sub influenţa diverşilor factori, pusee de herpes.

În cursul erupţiei herpetice, veziculele bogate în virus se sparg, contaminează buzele, degetele şi saliva şi prilejuiesc infectarea copiilor susceptibili.

Transmiterea virusului de la o generaţie la alta asigură supravieţuirea lui în natură. S-ar putea ca în cursul evoluţiei omului, virusul să fi fost transmis de la strămoşii lui cei mai îndepărtaţi.

În ceea ce priveşte virusul herpetic *B* (*simiae*), izolarea lui de către Sabin şi Wright (10) din creierul indivizilor morţi cu fenomene de encefalomielită apărută în urma muşcăturii maimuţelor aparent sănătoase a pus probleme interesante în ceea ce priveşte existenţa lui în natură.

Acest fapt cît şi punerea în evidenţă a anticorpilor specifici în sîngele maimuţelor *rhesus* şi *cynomolgus* par să justifice ipoteza că acest virus ar fi pentru maimuţă ceea ce virusul herpetic *simplex* este pentru om.

S-ar putea ca virusul herpetic *simplex* şi cel herpetic *B* să fi fost cîndva unul şi acelaşi virus pentru strămoşul comun al omului şi maimuţei, fiind cunoscut faptul că variaţiile caracterelor unui virus sînt determinate de interacţiunea dintre acesta şi mediul său, format din specia gazdă şi diverşi factori ecologici.

BIBLIOGRAFIE

1. Almeida, J. D., Howatson, A. F., Williams, M. G. — Virology, 1962, *16*, 353.
2. Andrewes, C. H. — Nature, 1954, *173*, 620.
3. Burnet, F. M., Williams, S. W. — Med. J. Australia, 1939, *1*, 637.
4. Cruickshank, J. G., Berry, D. M. — Virology, 1965, *25*, 481.
5. Cruickshank, J. G., Berry, D. M., Hay, B. — Virology, 1962, *20*, 376.
6. Dodd, K., Johnston, L. M., Buddingh, G. J. — J. Pediat., 1938, *12*, 95.
7. Melnick, J. L., Midulla, M., Wimberby, I., Barrera-Oro, J. G., Levy, B. M. — J. Immunol., 1964, *92*, 596.
8. Plummer, G., Waterson, A. P. — Virology, 1963, *19*, 412.
9. Reissig, M., Kaplan, A. S. — Virology, 1962, *16*, 1.
10. Sabin, A. B. — Brit. J. exp. Path., 1934, *15*, 248, 268, 321, 372.
11. Wildy, P., Russell, W. C., Horne, R. W. — Virology, 1960, *12*, 204.

Scanned with OKEN Scanner

VIRUSUL HERPETIC SIMPLEX

(HERPES HOMINIS)

ISTORIC

Denumirea de herpes vine de la un cuvînt grecesc şi înseamnă „a se tîrî" (*ramper*).

Grecii, romanii ca şi arabii denumeau „herpes" o serie de manifestări tegumentare cu aspect ulceros şi cu o evoluţie lentă, extensivă, „rampantă". În timpul Renaşterii, valoarea cuvîntului *herpes* a rămas aceeaşi.

Mai tîrziu, acest cuvînt a fost înlocuit în Franţa cu denumirea „dartre", care desemna un mare număr de dermatoze.

Alte clasificări ale bolilor de piele — care înglobau şi herpesul — ce se bazau pe morfologia butonului eruptiv şi nu pe etiologia sa, au fost făcute în Anglia (William şi elevul său Bateman) la sfîrşitul sec. XVII, în Franţa (Lovry, 1777); în Germania, Hebra a adoptat clasificarea engleză făcută de William.

Natura şi cauzele herpesului au început să preocupe pe cercetători numai la mijlocul sec. XIX. Basin, în 1855, recunoaşte o varietate de herpes provocat de cauze interne, în raport cu constituţia umorală a individului, şi altă varietate, provocat de cauze externe, prin diverşi iritanţi ai pielei.

Guibaut, în 1876, Verneuil în 1885, Hardy în 1886 şi Hillaret şi Graucher în 1890, dau clasificări patogenice ale herpesului, bazate mai ales pe aspectele clinice. Din acel moment, interpretările etiologice şi patogenice se înmulţesc. Cu o perspicacitate remarcabilă, aproape toate aceste interpretări atribuiau un rol important sistemului nervos (Verneuil, Parrot, Bouchard, Feulard).

Subliniind participarea sistemului nervos la procesul herpetic tegumentar, în 1904, Ravaut şi Darré (14) semnalează o reacţie limfocitară în lichidul cefalorahidian la 80,8% din bolnavii cu herpes genital.

Caracterul infecţios al herpesului şi transmisibilitatea sa experimentală la om au fost demonstrate în 1873 de către Vidal (17).

A trebuit însă să ajungem în anul 1912 pentru a înregistra experienţa fundamentală a lui Grüter care a dovedit că inocularea conţinutului veziculelor de herpes corneean uman produce la iepure o cheratită herpetică transmisibilă în serie. Aceste rezultate experimentale nu au fost însă publicate de autor, aşa încît ele nu au fost cunoscute. Totuşi, Grüter îl

informează pe Kraupa asupra descoperirii sale; Kraupa repetă această experienţă şi confirmă transmisibilitatea la iepure a herpesului corneean uman, dar nici el nu publică acest rezultat.

Prima lucrare asupra transmiterii virusului herpetic la iepure, în care sînt relatate şi experienţele lui Grüter şi Kraupa, apare în 1919 — 1920, scrisă de Löwenstein (11)(12). Prin inocularea pe corneea de iepure a lichidului vezicular recoltat din herpesul febril, autorul obţine leziuni herpetice identice cu cele din cheratita herpetică umană.

În cursul cercetărilor sale Löwenstein demonstrează însă un fapt foarte interesant, şi anume că iepurii care au avut o cheratită herpetică experimentală prezintă o imunitate locală.

Constată de asemenea că prin inocularea pe corneea de iepure a conţinutului veziculelor de arsură, eczemă, pemfigus etc. nu se pot reproduce leziuni de cheratită.

Toate aceste rezultate au dus la concluzia că herpesul simptomatic este determinat de un virus invizibil, capabil de a provoca la iepure o cheratită tipică, transmisibilă în serie.

De abia în 1920 Grüter (7) publică primele sale descoperiri şi arată totodată că lichidul din cheratita experimentală a iepurelui inoculat pe corneea unui orb determină o leziune herpetică tipică.

În acelaşi an, Baum (1) şi Stocker (15) demonstrează că lichidul veziculelor din herpesul *simplex* şi febril, inoculat pe corneea de iepure, determină în mod constant leziuni identice cu cele obţinute de Grüter şi Löwenstein.

Doerr (4) aduce alte date experimentale interesante. El observă că unii din iepurii inoculaţi pe cornee cu lichid vezicular recoltat din herpesul cornean sau labial fac fenomene nervoase caracterizate prin convulsii, trismus, mişcări rotatorii de partea afectată, pareze sau paralizii tranzitorii ale membrelor anterioare sau posterioare şi prezintă secreţie salivară abundentă.

Impreună cu Vöchting (6) autorul repetă şi confirmă primele sale experienţe. Cu această ocazie Doerr şi Vöchting constată că într-adevăr, aşa după cum a demonstrat Löwenstein, iepurii vindecaţi de o cheratită experimentală prezintă o rezistenţă locală faţă de reinocularea virusului, gradul ei depinzînd de perioada de timp scursă între prima şi cea de-a doua inoculare.

Tot Doerr şi Vöchting reproduc la iepuri o infecţie herpetică generalizată, prin inocularea intravenoasă a secreţiei conjunctivale prelevate de la iepurii cu cheratită experimentală.

Cu suspensiile cerebrale ale acestor animale autorii obţin, prin inocularea subdurală la iepure, boala experimentală caracteristică virusului herpetic.

În aceeaşi perioadă Levaditi şi Harvier (9) izolează virusul herpetic din creierul unui individ mort cu encefalită letargică şi, împreună cu Nicolau (10), studiază multe dintre proprietăţile acestui virus.

Scanned with OKEN Scanner

În 1921, Blanc (2) confirmă experienţele lui Doerr şi Vöchting şi arată că lichidul vezicular, recoltat din leziunile herpetice umane sau din leziunile de cheratită experimentală a iepurelui, inoculat subdural la iepure, determină o encefalită letală transmisibilă în serie. Cu emulsiile cerebrale ale acestor animale moarte cu fenomene de encefalită, autorii reproduc, prin inoculări pe cornee la iepure, leziuni de cheratită urmate uneori de encefalită letală.

Blanc şi Caminopetros (3), efectuînd pasaje repetate pe cale intracerebrală la iepure, obţin un virus herpetic fix, care determină la această specie animală apariţia fenomenelor de encefalită într-o perioadă de timp mult mai scurtă. Cu această ocazie autorii constată, de altfel ca şi Doerr şi Schnabel (5), că inocularea virusului pe corneea scarificată a iepurelui determină apariţia unei cheratite severe, care, după vindecare, lasă animalului o stare de imunitate faţă de inocularea subdurală. Aceşti autori au arătat de asemenea că lichidul vezicular din herpesul genital este tot atît de infectant ca şi lichidul vezicular din herpesul labial.

Doerr şi Vöchting (6) dovedesc că virusul herpetic luat de pe corneea de iepure şi trecut pe corneea de cobai determină aceleaşi leziuni de cheratită observate la iepure. Rezultatele acestor autori sînt apoi confirmate şi de Luger şi Lauda (13).

Blanc şi Caminopetros (3) demonstrează prin cercetările lor că atît maimuţa (*Macacus sinicus* şi *cynomolgus*) inoculată pe cornee, cît şi cîinele, porumbelul şi broasca infectate cerebral sînt rezistente faţă de virusul herpetic.

Ulterior, Teissier, Gastinel şi Reilly (16) testează sensibilitatea şobolanului faţă de virusul herpetic; inoculînd virusul pe cornee ei observă la unele animale prezenţa de leziuni corneene foarte discrete; microscopic autorii pun în evidenţă, la animalele cu şi fără leziuni corneene, prezenţa virusului în sistemul nervos central, dovedind astfel că virusul se propagă de la locul de inoculare spre sistemul nervos central.

Toate aceste experienţe au constituit punctul de plecare pentru studiul herpesului, permiţînd experimentatorului să precizeze numeroase date privind infecţia herpetică, proprietăţile şi structura virusului etc.

BIBLIOGRAFIE

1. Baum, O.—Derm. Wschr., 1920, *70*, 105.
2. Blanc, G. — C. R. Acad. Sci., 1921, *172*, 725.
3. Blanc, G., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, *84*, 859.
4. Doerr, R. — Klin. Monatsbl. Augenh., 1920, *65*, 104.
5. Doerr, R., Schnabel, A. — Schweiz. med. Wschr., 1921, *51*, 469 şi 562.
6. Doerr, R., Vöchting, R. — Rev. gén. ophthalm., 1920, *34*, 409.
7. Grüter, W. — Klin. Monatsbl. Augenh., 1920, *65*, 398.

Scanned with OKEN Scanner

8. KRAUPA, E. — Münch. med. Wschr., 1920, 67, 1236.
9. LEVADITI, C., HARVIER, P. — C. R. Soc. Biol. (Paris), 1920, 83, 354.
10. LEVADITI, C., HARVIER, P., NICOLAU, S. — C.R. Soc. Biol., 1921, *85*, 213, ; Ann. Inst. Pasteur, 1922, *35*, 1.
11. LÖWENSTEIN, A. — Münch. med. Wschr., 1919, *66*, 769.
12. LÖWENSTEIN, A. — Klin. Monatsbl. Augenh., 1920, *64*, 15.
13. LUGER, A., LAUDA, E., — Z. ges. exp. Med., 1921, *24*, 289.
14. RAVAUT, DARRÉ — Ann. Derm. Syph., 1904, *5*, 481.
15. STOCKER, F. — Klin. Monatsbl. Augenh., 1920, *65*, 298.
16. TEISSIER, P., GASTINEL, P., REILLY, J. — C. R. Soc. Biol., 1922, *86*, 73 şi 75.
17. VIDAL, J. B. — Ann. Derm. Syph., 1873, *4*, 350.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 1

AGENTUL PATOGEN

STRUCTURĂ ŞI COMPOZIŢIE

1. NATURA VIRUSULUI HERPETIC

Puţin timp după deschiderea erei experimentale a herpesului, Veratti şi Sala (52) au presupus că boala herpetică ar fi cauzată de un ferment, o enzimă, care s-ar reproduce în procesul fermentativ transmisibil în serie.

Totuşi, în acelaşi an, Levaditi şi Nicolau (27) studiază diferitele proprietăţi fizice ale virusului şi, în urma experienţelor lor clasice de ultrafiltrare prin membrane de colodiu, afirmă că aceste microorganisme „sînt constituite din agregate de materie proteică *vie*"; caracterul „*viu*" al virusului era primordial în concepţia acestor autori care, pentru prima oară, precizează şi diferenţa de dimensii a corpusculilor elementari — a virionilor — ai diferitelor viroze.

Ulterior, Doerr (8) şi Naegeli (33) au susţinut natura *neanimată* a virusului herpetic. După aceşti autori ar fi vorba de un principiu autogen, un ferment care ia naştere în cursul procesului patologic, putînd să se regenereze în contact cu celulele sensibile; aceasta ar explica transmisibilitatea în serie, în mod indefinit.

Pentru Gastinel (14), acest fel de a vedea tinde să repună în discuţie criteriul actual al fenomenelor vitale, fapt care ar plasa această problemă în domeniul metafizicii. Nicolau, încă din al 3-lea deceniu al acestui secol, considera virusul herpetic drept un inframicrob *puţin evoluat* pe scara taxonomică a microorganismelor, în situaţia de a nu-şi putea realiza singur metabolismul nutritiv; aceasta ar fi explicaţia parazitismului său obligatoriu pe celula vie. În 1935, acelaşi autor (1), utilizînd rezultatele obţinute de către diferiţi experimentatori şi ale sale proprii în studierea acţiunii ultrapresiunii asupra diferitelor elemente (celule, microbi, virusuri, bacteriofagi şi fermenţi), demonstrează clar că virusul herpetic nu este o enzimă. Acest germen — ca şi alte virusuri — îşi pierde puterea patogenă în 30 minute la 3 000 atmosfere, în timp ce fermenţii nu sînt inactivaţi decît la presiuni care depăşesc 12 000 atmosfere.

2. TROPISMUL VIRUSULUI

Datorită dimensiei sale mici (70 — 200 mμ) virusul herpetic nu a putut fi multă vreme pus în evidenţă cu ajutorul microscopului obişnuit. Primii autori care au izbutit să coloreze şi să pună astfel în evidenţă cor-

Scanned with OKEN Scanner

pusculii elementari herpetici au fost Taniguchi şi colab. (50). Cu ajutorul coloraţiei Giemsa, aceşti autori observă pe frotiurile de lichid vezicular din herpesul labial şi pe cele de cornee de iepure, prezenţa unor mici formaţiuni corpusculare de formă rotundă, cu diametrul în jurul a 0,25 μ.

În acelaşi an Herzberg (17) colorează virusul herpetic în stare proaspătă, cu albastru Victoria.

Fig. 1. — Corpusculi elementari herpetici, umplînd nucleul neuronilor şi celulelor gliale, în encefalul iepurilor morţi de encefalită herpetică experimentală. Primele opt celule, neuroni, au nucleul transformat în colonii de inframicrobi; *a*, *b*, *c* şi *d*, nucleii celulelor gliale umpluţi cu germeni herpetici. Nicolau şi Kopciowska, 1937.

Cîţiva ani mai tîrziu, Nicolau şi Kopciowska (35) (36) reuşesc de asemenea să pună în evidenţă prezenţa corpusculilor elementari herpetici în ţesutul animalelor de experienţă. Colorînd cu ajutorul unei tehnici speciale (albastru de metil oxalatat în soluţie hidro-alcoolică glicerinată), secţiuni foarte fine de creier de iepure mort de encefalită herpetică experimentală, Nicolau şi Kopciowska demonstrează că agentul etiologic al herpesului este un inframicrob mic de formă coco-bacilară (fig. 1). Aceiaşi

corpusculi elementari au putut fi găsiţi şi în formaţiile similare din cornee sau piele.

S-a arătat de asemenea că inframicrobul herpetic se poate găsi nu numai în nucleul neuronilor encefalici, medulari sau ganglionari, nu numai în celulele epiteliului corneean sau tegumentar, ci şi în nucleul celulelor gliale, în citoplasma neuronilor (fig. 2), în citoplasma monocitelor de infiltraţie meningeană (fig. 3) sau parenchimatoasă (encefal) şi în celulele en-

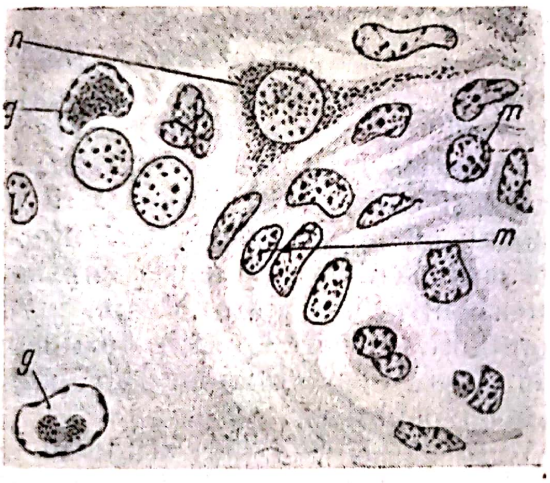


Fig. 2. — Corpusculi elementari herpetici în celulele din creierul iepurelui mort de encefalită herpetică experimentală; *n*, neuron cu virus în citoplasmă; *g*, nuclei de microglii umpluţi cu inframicrobi; *m*, celule ale peretelui vascular. Nicolau şi Kopciowska, 1937.

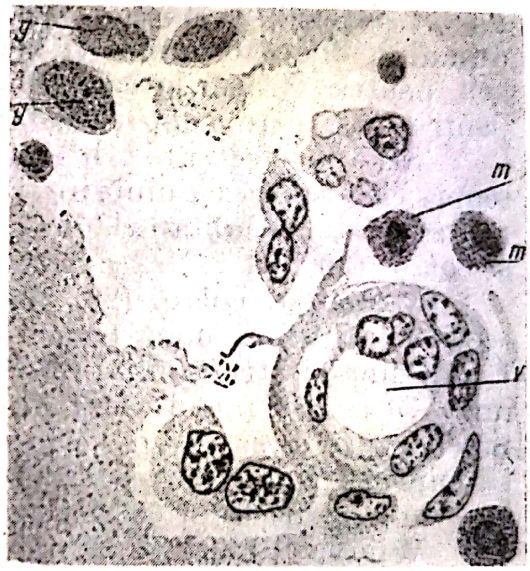


Fig. 3. — Corpusculi elementari herpetici în celulele din creierul iepurelui mort de encefalită herpetică; *v*, vas; *g*, celule gliale cu nucleul umplut cu germeni herpetici; *m*, celule mononucleare cu citoplasma plină cu corpusculi elementari. Nicolau şi Kopciowska, 1937.

doteliale ale vaselor cerebrale la iepurii morţi de boala experimentală (35) (36).

Aglutinatele de aceşti germeni, realizate în nucleu sau în citoplasmă prin mijloacele de apărare celulară, formează incluziile herpetice (Nicolau şi Kopciowska).

Noţiunile de tropism (neurotropism, dermotropism, viscerotropism, mezotropism, ectodermotropism, epiteliotropism, endodermotropism etc.) apar labile, fiindcă prin adaptare şi selecţie se pot devia tropismele virusurilor. Herpesul este etichetat ca o ectodermoză neurotropă. *Grosso modo* da. S-ar părea justă clasificarea sa în acest grup. Prezenţa corpusculilor elementari ce formează colonii atît în celule gliale, în monocite cît şi în endoteliul vascular arată însă cît de puţin exactă este în realitatea această etichetare.

3. MORFOLOGIA CORPUSCULULUI ELEMENTAR

O dată cu dezvoltarea şi perfecţionarea tehnicilor de laborator, cercetările au fost dirijate şi asupra studiului structurii fine a particulelor virotice. Încă din 1956, Crick şi Watson (6) au presupus că toate virusurile mici (plante sau animale) de formă sferică sau rotundă sînt formate din subunităţi proteice identice, dispuse regulat în jurul acidului nucleic virotic. Tot aceşti autori au presupus de asemenea că toate virusurile mici, „sferice", ar avea o simetrie cubică 5 :3 :2 (caracteristică tetrahedronului, dodecadronului şi icosahedronului) şi că aceasta ar fi valabilă atît pentru virusurile care conţin acid dezoxiribonucleic (ADN), cît şi pentru cele care conţin acid ribonucleic (ARN).

Studiile efectuate prin metode moderne ca difracţia cu raze X, microscopia electronică cu umbrire şi microscopia electronică cu contrast negativ (3), au dat posibilitatea lui Caspar (4), Williams şi Smith (59) şi Horne şi colab. (20, 21, 22) să demonstreze postulatele lui Crick şi Watson.

Morgan şi colab. (29, 30, 32), Falke şi colab. (13) diferenţiază pe secţiuni ultrafine, două tipuri de corpusculi elementari herpetici, diferiţi ca mărime şi structură. Unii din aceşti corpusculi de dimensia cuprinsă între 70 şi 100 mμ, formaţi dintr-un miez central înconjurat de un singur înveliş, ar fi, după autori, corpusculi incompleţi, imaturi, iar alţii, de dimensii cuprinse între 100 şi 180 mμ, care în cursul dezvoltării lor au căpătat încă un înveliş, ar fi corpusculi elementari compleţi.

Wildy, Russell şi Horne (57) şi Wildy şi Horne (56) studiază cu ajutorul contrastului negativ morfologia virusului herpetic simplex cultivat pe celule HeLa şi de embrion de găină, după purificare prin ultracentrifugare, combinată cu cromatografie pe coloană de „brushită", şi constată că particulele virotice prezintă o structură formată dintr-un miez central sau nucleoid, o capsidă şi un înveliş exterior.

În figura 4 este reprezentată în mod schematic structura corpusculului elementar herpetic (Horne, 1963).

Miezul central sau nucleoidul este constituit din ADN (11). El are un diametru de 775 ± 5 Å şi este de formă hexagonală (fig. 5); uneori poate lipsi din unele particule virotice. După Wildy şi colab. aceste particule fără miez central reprezintă foarte probabil particule virotice neinfectante.

Capsida are un diametru exterior de 1050 ± 50 Å şi un profil aproape hexagonal (fig. 6). În spaţiu, ea are forma unui icosahedru regulat, fiecare faţă a sa fiind un triunghi echilateral.

Capsida se compune din 162 de subunităţi structurale sau capsomere goale (12 de formă pentagonală şi 150 de formă hexagonală), dispuse radial, într-o ordine regulată, la distanţe egale, pe feţele, muchiile şi vîrfurile triunghiului (3 pe fiecare faţă, 3 pe fiecare muchie şi 1 pe fiecare vîrf) (fig. 7).

Numărul total al capsomerelor rezultă din formula lui Wildy şi Horne (58): $N = 10\,(n-1)^2 + 2$, în care n reprezintă numărul capsomerelor aşezate de-a lungul muchiei triunghiului.

În ansamblu, capsida are o simetrie axială de 5 : 3 : 2. Ea a fost explicată de Horne (19) în felul următor : proiecţiile din centrul icosahedrului

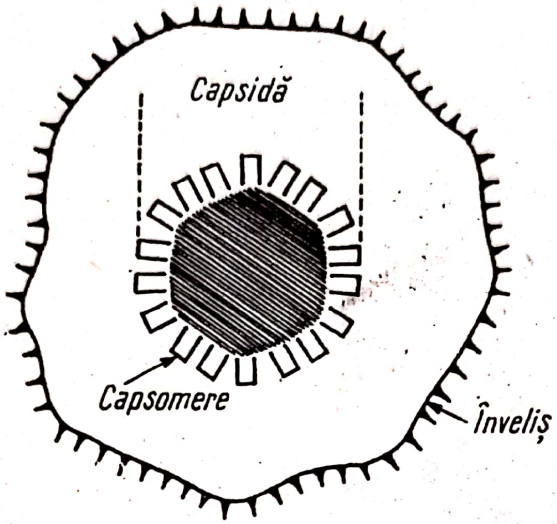


Fig. 4. — Structura schematică a corpusculului elementar herpetic. Horne, 1963.

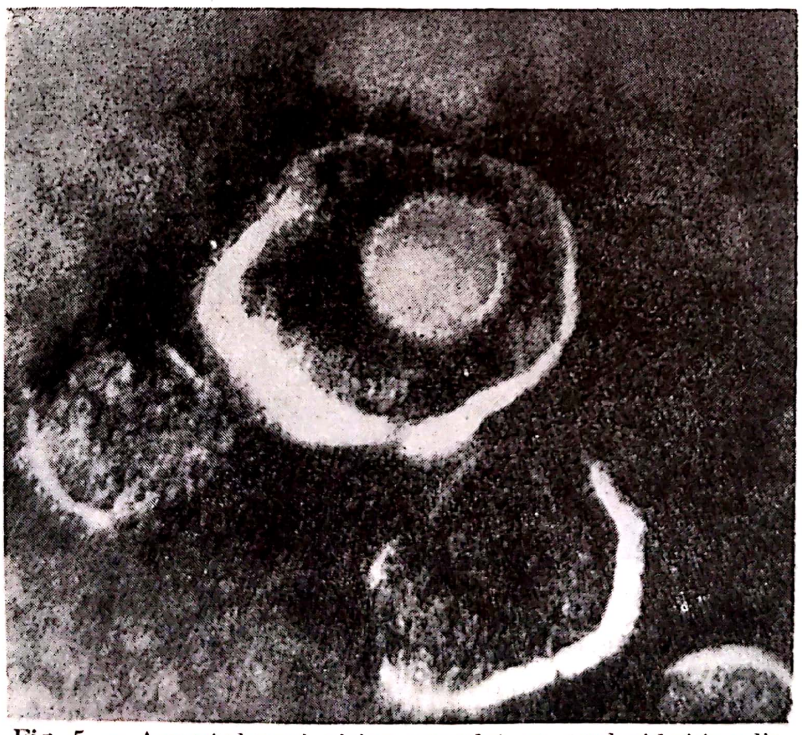


Fig. 5. — Aspectul unui virion complet cu nucleoid şi înveliş. Se observă forma hexagonală a capsidei. Lépine, 1965.

către vîrfurile triunghiurilor reprezintă o axă, cele proiectate din centrul icosahedrului la mijlocul fiecărei feţe cea de-a doua axă şi cele proiectate

din același centru la mijlocul fiecărei muchii, cea de-a treia axă a simetriei rotative. Există deci 12 proiecții către vîrfuri, 20 către fețe și 30 către muchii (fig. 8). Privind icosahedrul în lungul proiecției fiecărui vîrf se observă că acest corp poate fi rotat în 5 poziții fără să-și modifice aparența

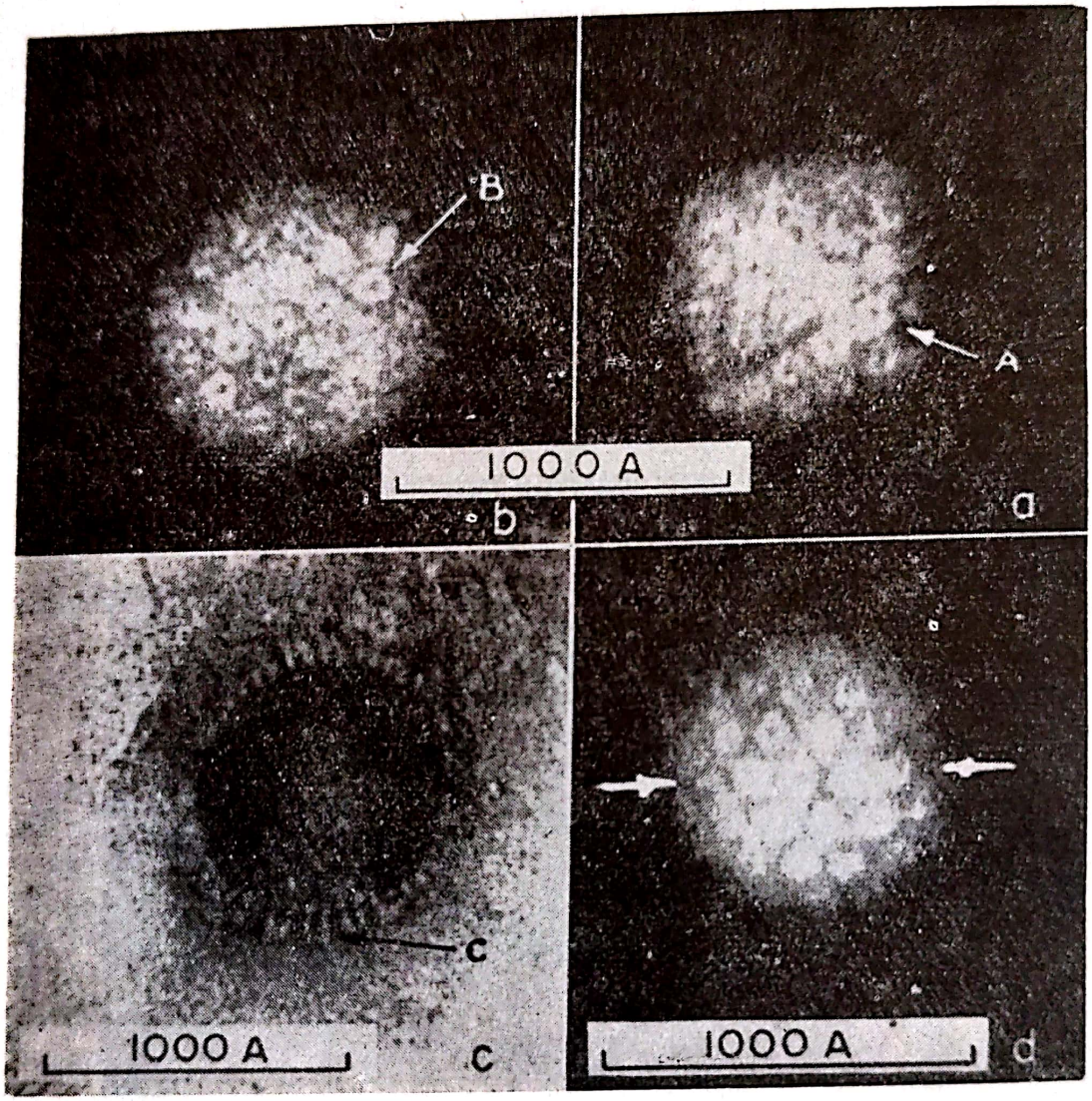


Fig. 6. — Imagine electronooptică. Celule HeLa infectate cu virus herpetic *simplex*. În *a*, capsida formată din capsomere cu 5 laturi situate în axul simetriei de 5. În *b* se constată prezența de capsomere hexagonale. În *c*, capsidă goală cu capsomerele aranjate radial. În *d*, capsidă cu capsomere goale, de formă hexagonală. Wildy, Russell și Horne, 1960.

sa; privit în lungul proiecției oricărei fețe el poate fi rotat în 3 poziții, iar în lungul proiecției oricărei muchii în 2 poziții, fără să-și modifice aparența sa. De aici deducția că virusul herpetic are o simetrie 5 : 3 : 2.

S-a constatat de către Wildy și colab. că structura capsidei este foarte stabilă, ea nefiind influențată de îngheț-dezgheț, pH-uri diferite,

apă distilată, temperatura de 37°, vibraţii ultrasonice, eter, diverşi detergenţi, tripsină, ficină, papaină sau tratare cu anticorpi herpetici neutralizanţi.

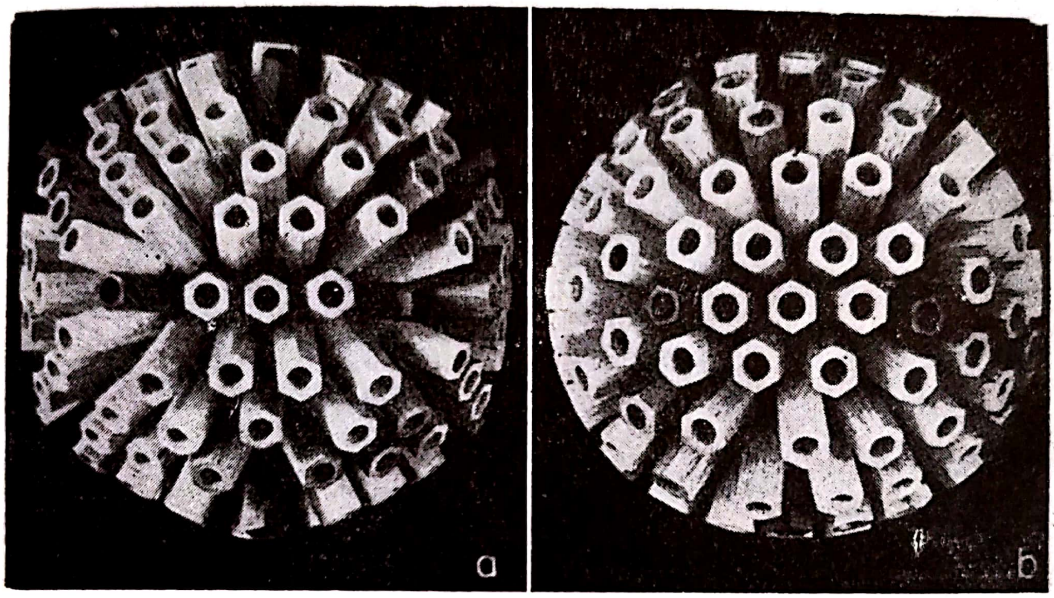


Fig. 7. — Două modele (*a* = formă icosahedrică; *b* = formă sferică), reprezentînd virusul herpetic, constituite din 150 prisme hexagonale şi 12 prisme pentagonale găurite. Wildy, Russell şi Horne, 1960.

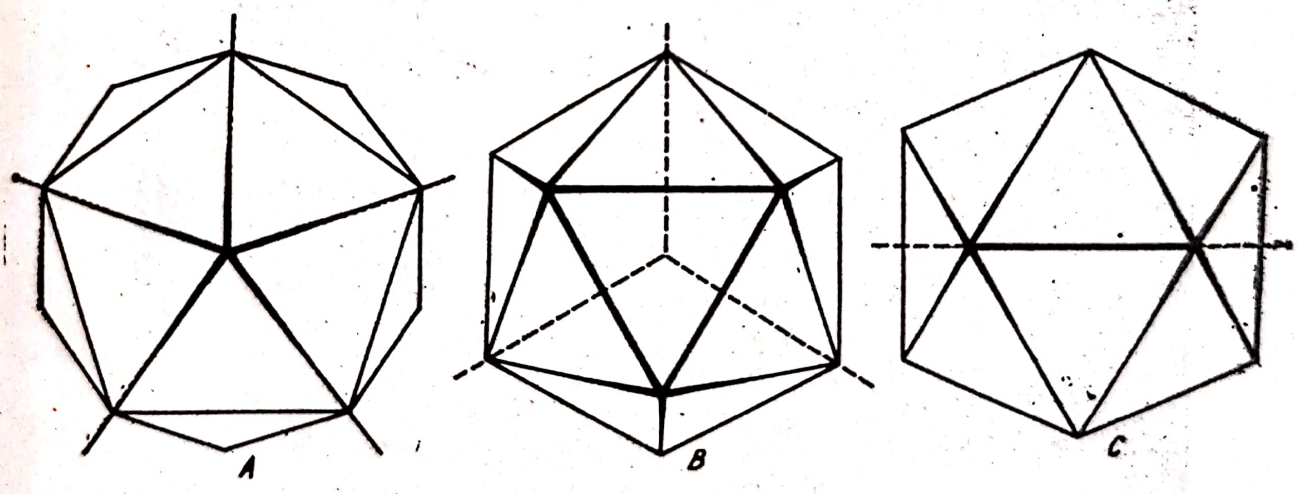


Fig. 8. — Axele simetriei icosahedrului (corp cu 12 vîrfuri, 20 feţe şi 30 muchii). Acest corp privit în lungul proiecţiei fiecărui vîrf poate fi rotit în 5 poziţii (*A*) fără să-şi modifice aparenţa; privit în lungul proiecţiei oricăre feţe, poate fi rotit în 3 poziţii (*B*), iar în lungul proiecţiei oricărei muchii, poate fi rotit în 2 poziţii (*C*), de asemenea fără să-şi modifice aparenţa. Horne, 1963.

Capsomerele, subunităţi ce compun capsida, au un diametru de 95±1 Å şi structuri alungite. În secţiune transversală ele sînt de aspect poligonal cu goluri axiale (fig. 7) de aproximativ 40 Å. Examinate în lungul

axului lor longitudinal, acești autori au observat că în majoritatea cazurilor ele au forma unei prisme hexagonale, mai rar pentagonale, cu o lungime de 120 — 125 Å.

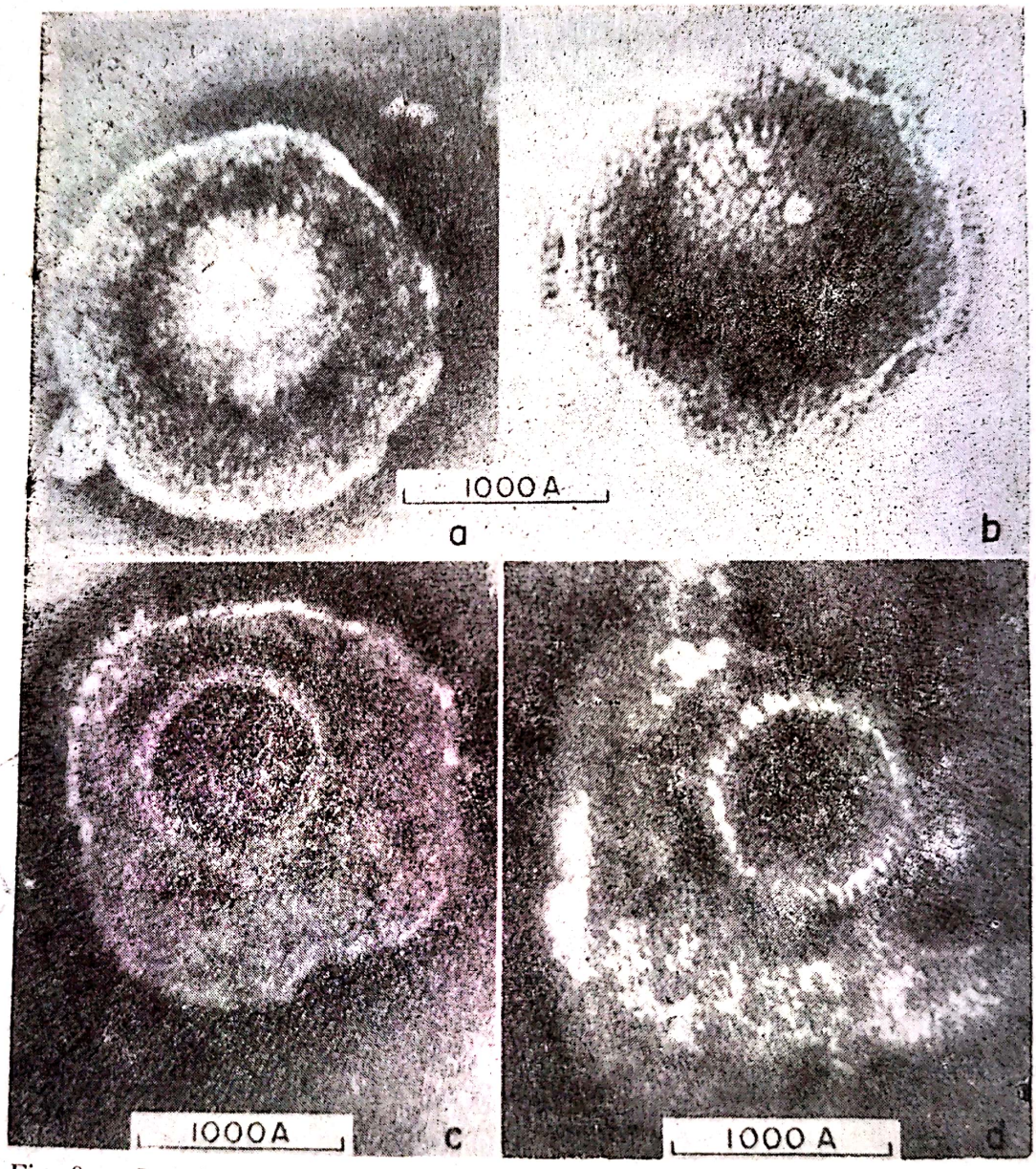


Fig. 9. — Imagine electronooptică. Celule HeLa infectate cu virus herpetic *simplex*. Se observă 4 particule cu înveliș. Wildy, Russell și Horne, 1960.

S-a admis de către Wildy și colab., deși nu s-au făcut studii chimice mai aprofundate, că aceste capsomere sînt formate dintr-o substanță proteică cu o greutate moleculară de 500 000. Aceasta pare a fi formată la rîndul ei din 5—6 subunități proteice, fiecare cu o greutate moleculară în jurul a 80 000 — 100 000.

Scanned with OKEN Scanner

Invelişul particulei virotice (fig. 9) are un diametru de 1800 Å (1 450—2 000 Å). Periferia sa are aspectul unei membrane mai dense, cu o grosime de 40 — 50 Å, sau, în unele locuri, chiar de 100 Å. Caracteristice acestei componente a particulei virotice sînt însă prelungirile de la periferia sa care, după măsurătorile acestor autori, au o lungime de 80 — 100 Å.

S-a putut observa că unele particule nu au înveliş şi au fost considerate ca particule incomplete de virus.

Epstein (10) studiază structura şi compoziţia particulelor virotice mature, pe preparate (celule HeLa infectate) fixate în acid osmic şi permanganat de K şi apoi incluse fie în metacrilat, fie în aquon (răşină epoxi, care are calitatea de a nu se contracta în timpul polimerizării şi de a nu permite deformarea secţiunii de către lama cuţitului). După datele obţinute de autor forma şi dimensia virusului matur variază în funcţie de metoda de incluzionare folosită (metacrilat sau aquon).

Astfel, pe secţiunile obţinute din preparatele incluzionate în metacrilat, autorul constată prezenţa unui mare număr de particule virotice în afara celulelor, uneori de aspect rotund, însă cel mai frecvent de aspect ovular, cu un diametru mediu de 120 mμ.

Pe preparatele incluzionate în aquon dimensia şi structura virusului herpetic matur par a fi cele mai reale. Dimensia constatată (165 mμ pe toate preparatele demonstrează că această metodă de incluzionare înlătură deformarea particulelor.

După autor, particula virotică matură conţine un nucleoid format din acid nucleic de tipul dezoxiriboză. Pe preparatele fixate în permanganat sau acid osmic şi incluzionate în aquon nucleoidul este de formă sferică, plasat excentric, pe cînd pe cele fixate în acid osmic şi incluzionate în metacrilat el este central, de formă rotundă, ovalară sau în bastonaş cu capetele rotunjite.

Pentru Epstein, varietatea formelor nucleoidului s-ar datora planurilor de secţionare, fapt care ar explica lipsa nucleoidului pe unele secţiuni.

Pe microfotografiile preparatelor fixate în acid osmic particulele au o membrană exterioară uşor vizibilă, iar pe cele ale preparatelor fixate în permanganat au o structură din 3 straturi, foarte evidentă prin incluzionări în aquon. Structural, această membrană are un aspect identic cu membrana celulară (fig. 10), adică este formată din 2 straturi a 5 mμ, opace la electroni, despărţite de o zonă mai puţin densă, fapt semnificativ în ceea ce priveşte mecanismul de eliberare a virusului din celulă.

Aceste date, cît şi cele ale lui Morgan şi colab. (32), Stoker şi colab. (48) şi Falke şi colab (13) demonstrează aşadar că învelişul particulei virotice nu ar fi altceva decît materialul celulei gazdă luat de virusul nou format o dată cu trecerea sa în citoplasmă.

De altfel, Epstein şi Holt (12), studiind electronooptic celule HeLa inoculate cu virus herpetic, după fixare în glutaraldehidă şi tratare citochimică cu adenozin-trifosfatază conţinută în mediul Wachstein şi Meisel

(53), constată că prezenţa acestei enzime se află în jurul virusului matur şi corespunde cu aceea de la suprafaţa membranei celulare (fig. 11 şi 12).

Recent Watson, Russell şi Wildy (54), folosind aceeaşi metodă de colorare negativă (acid fosfotungstic), diferenţiază pe preparatele lor şi alte aspecte morfologice ale corpusculilor elementari herpetici, care

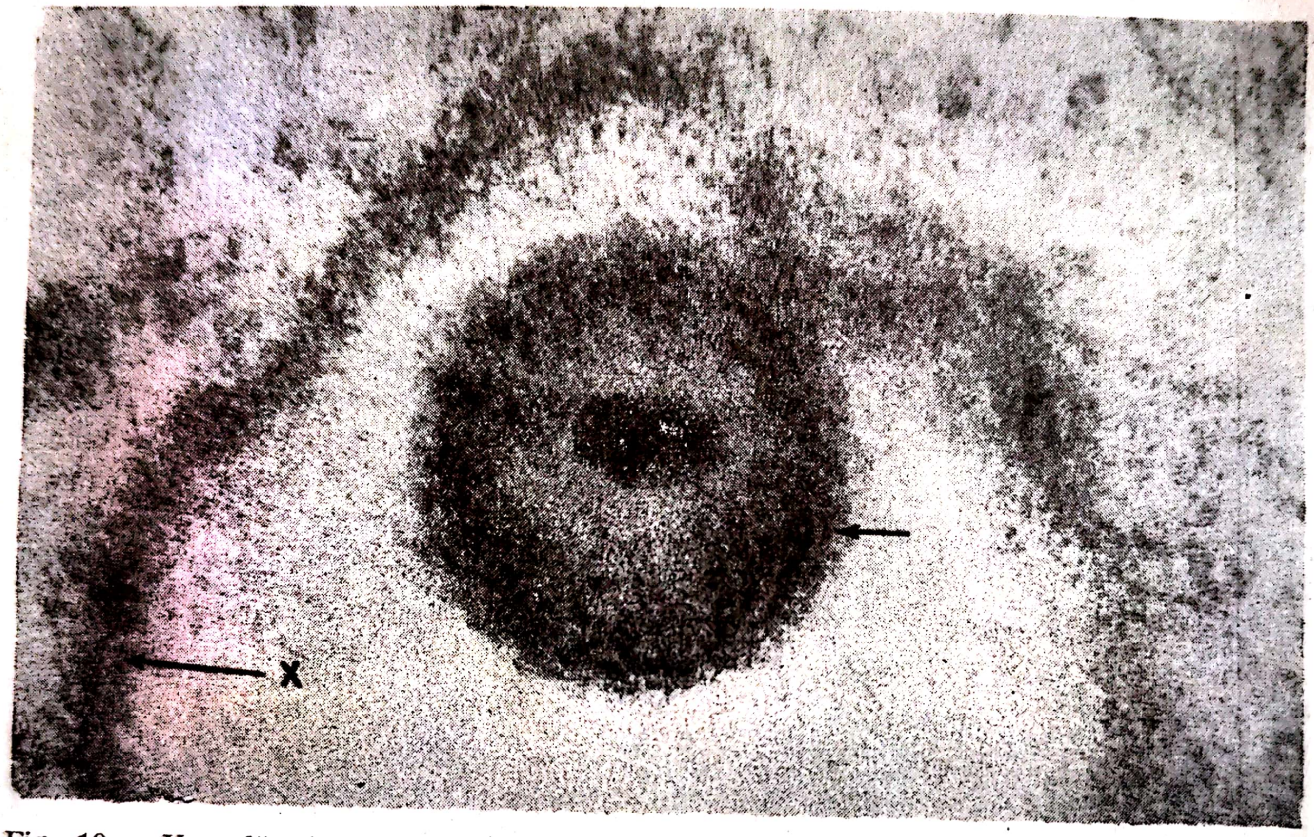


Fig. 10. — Vacuolă citoplasmică în care se constată prezenţa unei particule mature de virus herpetic. Particula prezintă un nucleoid în formă de baghetă dispusă excentric şi un înveliş extern format din 3 straturi (→). În *x* se observă peretele vacuolei care are aceeaşi structură cu învelişul extern al particulei virotice. Epstein, 1962.

în fond nu sînt altceva decît combinaţia dintre particulele fără nucleoid şi cele fără înveliş (fig. 13), frecvenţa cea mai mare (50 — 60%) fiind dată de particule fără înveliş însă cu nucleoid.

4. STRUCTURA CHIMICĂ A CORPUSCULULUI ELEMENTAR

După cum s-a arătat mai sus, virusul herpetic se multiplică în nucleul celulei şi determină leziuni celulare prin care se deosebeşte de multe alte virusuri.

Newton şi Stoker (34), studiind virusul herpetic (tulpina HFEM) în culturi de celule HeLa constată faţă de celulele neinfectate, o creştere rapidă (în 3 — 6 ore de la infectare) a cantităţii de ADN în nucleul celu-

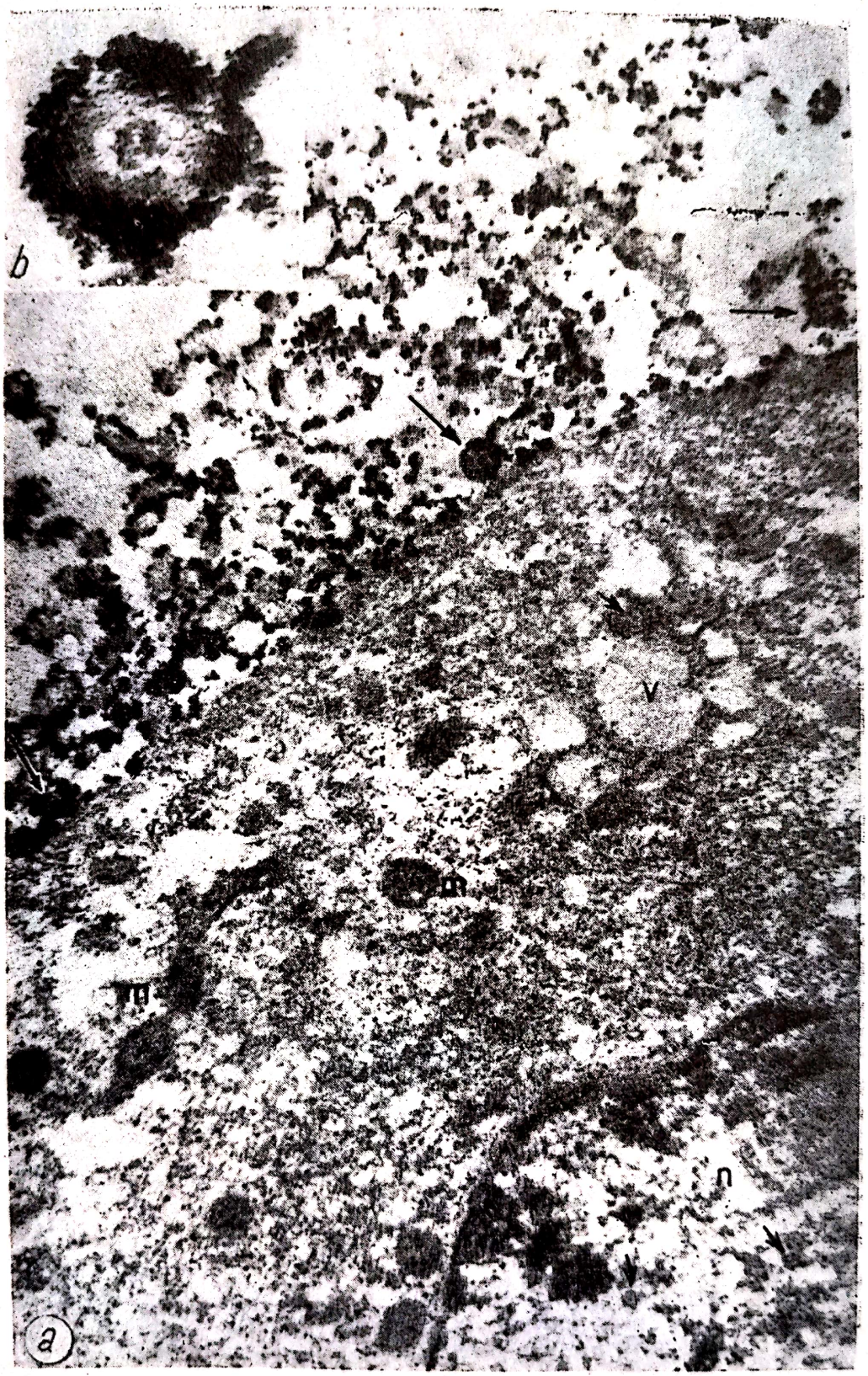


Fig. 11. — O celulă HeLa infectată cu virus herpetic *simplex*, fixată în glutaraldehidă și colorată apoi citochimic pentru enzimele de suprafață. Se observă localizarea produsului de reacție enzimatică (fosfatul de Pb) atît în jurul membranei celulare cît și în jurul particulelor de virus matur (→). În nucleu (*n*) și citoplasmă (*c*) sînt prezente particule de virus (→) imatur. În *m*, mitocondrii; în *v*, vacuole. Imaginea din stînga sus reprezintă detaliul unei particule virotice mature cu produsul de reacție enzimatică în jurul membranei sale externe. Epstein și Holt, 1963.

Scanned with OKEN Scanner

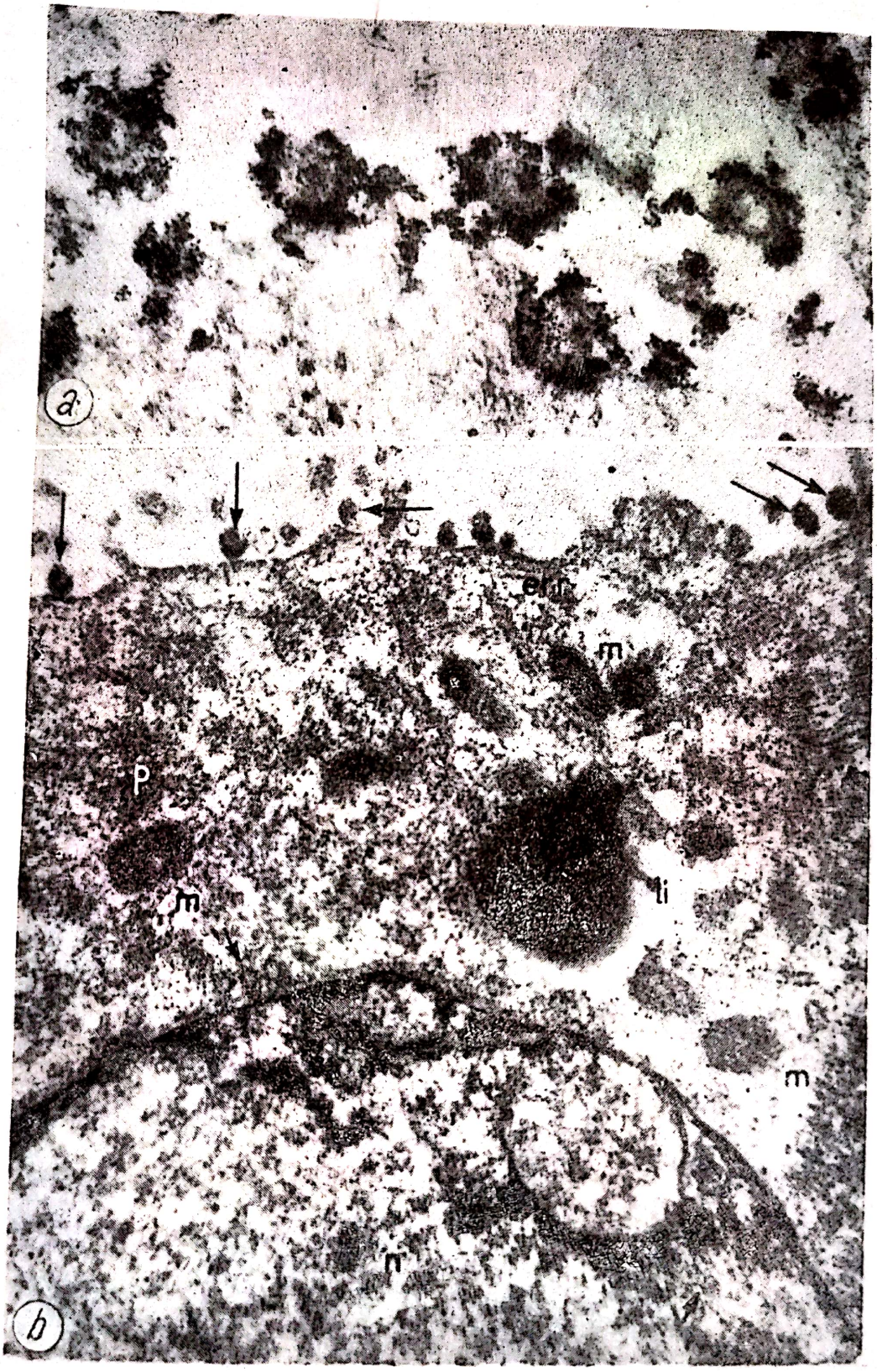


Fig. 12. — Porţiune de celulă HeLa infectată cu virus herpetic *simplex*.
a. Cinci particule virotice mature secţionate în diverse planuri sînt situate la periferia membranei celulare. Se constată în jurul lor produsul de reacţie enzimatică.
b. Imagine, în care nu se observă prezenţa produsului de reacţie enzimatică în jurul membranei celulare şi a particulelor virotice mature (→). În nucleu (*n*) şi citoplasmă (*c*) sînt prezente particule virotice imature (→). În *p*, particule virotice libere; în *li*, corp lipidic; în *m*, mitocondrii; în *err*, reticul endoplasmic. Epstein şi Holt, 1963.

Scanned with OKEN Scanner

lelor (fig. 14), cantitatea de ARN fiind nemodificată. După autori, ADN-ul nuclear creşte progresiv cu apariţia particulelor infectante de virus, astfel încît la 72 de ore de la infectare se găseşte de 2 ori mai mult ADN decît în celulele HeLa neinfectate (fig. 15).

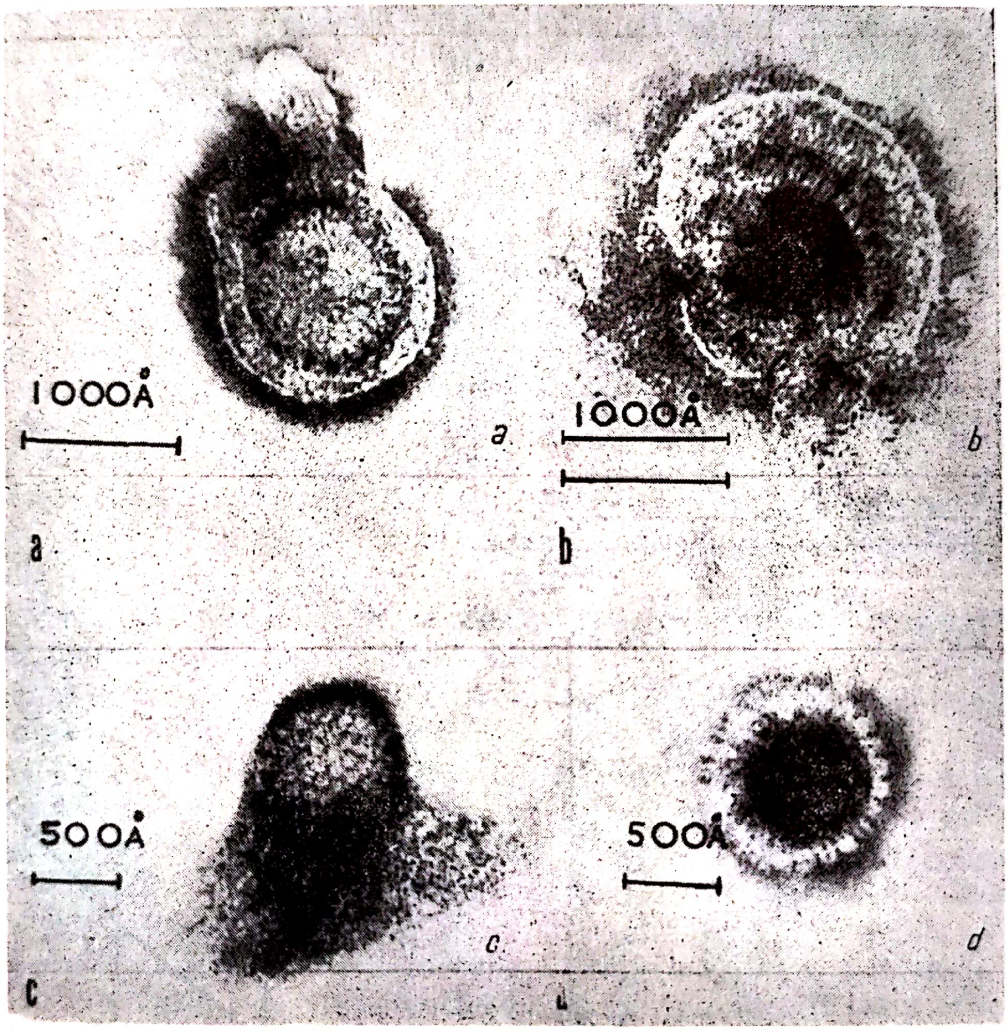


Fig.13. — Imagine electronooptică în care se observă patru tipuri morfologice de particule virotice de herpes *simplex*; *a*, particulă plină, cu înveliş; *b*, particulă goală cu înveliş; *c*, particulă plină fără înveliş; *d*, particulă goală, fără înveliş. Watson, Russell şi Wildy, 1963.

ADN-ul celular este sintetizat de celule imediat ce au fost infectate cu virus herpetic într-o cantitate care depăşeşte cu mult pe aceea extrasă din particulele vitrotice. Toate aceste date nu au putut însă stabili o relaţie între ADN-ul celular şi conţinutul particulelor virotice.

Tamm şi Bablanian (49), studiind rolul ARN-ului în sinteza virusurilor după tratare cu ribonuclează, presupun că virusul herpetic conţine ADN.

Scanned with OKEN Scanner

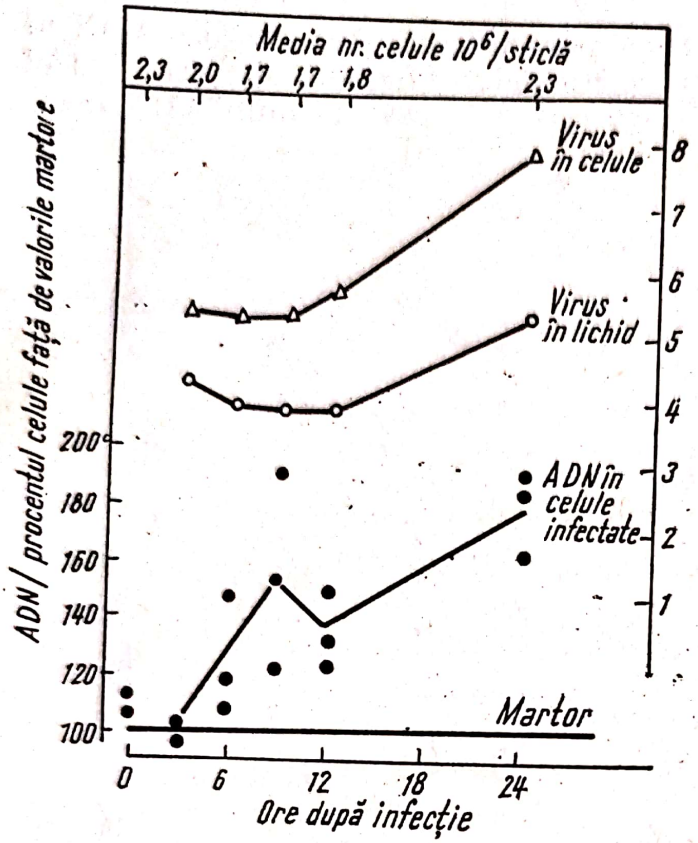


Fig. 14. — Conținutul în virus și ADN al celulelor HeLa după inoculare cu virus herpetic, la diverse intervale de timp de la infectare. Newton și Stoker, 1958.

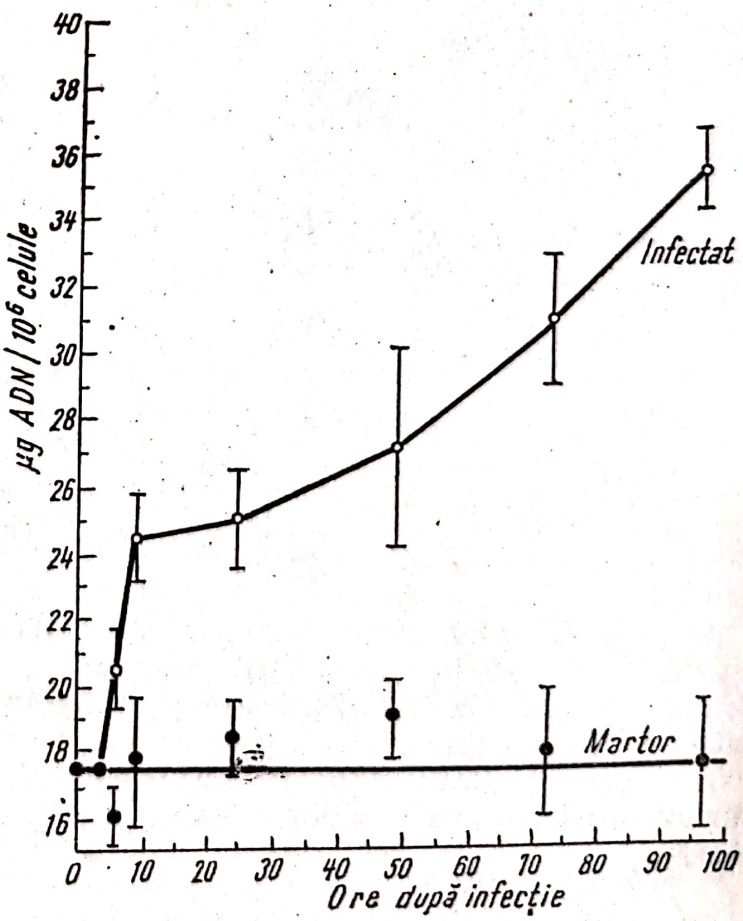


Fig. 15. — Conținutul în ADN al celulelor HeLa după infectare cu virus herpetic. Newton și Stoker, 1958.

Scanned with OKEN Scanner

Ross şi Orlans (42), cercetînd de asemenea distribuţia ADN-ului în celulele HeLa infectate cu virus herpetic *simplex*, constată o acumulare a lui sub formă difuză.

O creştere de ADN în nucleul celulei infectate cu virus herpetic o obţin de asemenea Kaplan şi Ben-Porat (23).

Studiind electronooptic fazele de dezvoltare ale virusului herpetic *simplex* în celulele renale de iepure, Tardini şi colab. (51) constată o creştere a ADN-ului în celule înainte ca particulele virale să apară.

Faptul că virusul herpetic determină în timpul perioadei sale de multiplicare o acumulare de ADN în nucleul celulelor infectate a sugerat ideea că el însuşi conţine ADN.

Prin coloraţia cu acridin-orange, Roizman (40) constată că în primele 24 de ore de la infectare nucleii celulelor sinciţiale, distribuiţi în mod egal în toată masa citoplasmei, apar coloraţi în verde avînd pe suprafaţa interioară a membranei lor o cantitate mare de granule colorate în galben, traducînd prezenţa de ADN. Citoplasma celulelor apare colorată în roşu brun, fluorescent. Dispariţia acestei fluorescenţe prin tratare cu ribonuclează dovedeşte că citoplasma conţine ARN.

Între 24 şi 48 de ore de la infectare nucleii sinciţiali încep să se aglomereze, pentru ca între 36 şi 72 de ore să formeze o masă intens colorată în galben fluorescent cu acridin-orange.

Această masă de nuclei aglomeraţi prezintă un strat subţire de citoplasmă colorat caracteristic ARN-ului.

Evidenţierea ADN-ului în nucleul celulei confirmă deci ipoteza că sinteza antigenului viral herpetic are sediul în nucleu.

Ulterior, Kaplan şi Ben-Porat (24) arată că sinteza virusului herpetic este blocată de 5-fluorouracil şi deblocată apoi prin adăugarea timidinei, ceea ce dovedeşte că virusul herpetic conţine ADN, fapt evidenţiat de altfel de către Crouse şi colab. (7) prin metode citochimice.

Wildy, Smith, Newton şi Denty (58) constată microspectrofotometric pe preparatele colorate cu metoda Feulgen o creştere a ADN în nucleii celulelor infectate, însă după perioada de lag. În acelaşi timp ei observă autoradiografic o scădere a încorporării timidinei marcate, fenomen pe care-l explică ca fiind în legătură cu o tulburare a replicării ADN-ului celulei gazdă în urma infectării ei cu virusul herpetic.

Russell (43) demonstrează de asemenea că fracţiunea infectantă a virusului herpetic (tulpina HFEM) cultivat pe celule HeLa, după absorbţie pe coloană de fosfat de calciu şi eluare, este constituită din ADN. Determinarea cantitativă prin absorbţie în ultraviolet a ADN-ului extras din virus cu ajutorul detergenţilor a dus la rezultate identice cu cele obţinute din virusul total prin reacţia cu difenil-amină.

Marcînd virusul cu P^{32} şi făcînd aceeaşi extracţie de ADN, autorul constată că 85% din radioactivitate se găseşte asociată cu dezoxiribonu-

cleotidele (fig. 16) şi numai 1% cu ribonucleotidele, fapt care demonstrează că ARN-ul reprezintă numai o impuritate şi nicidecum o componentă a virusului.

Rezultatele digestiilor enzimatice (DNază şi RNază) obţinute de Epstein (10)(11) pe preparatele de virus herpetic matur au dovedit că nucleoidul conţine acid nucleic de tipul dezoxiriboză. De asemenea Gibbons (16) afirmă că aquonul folosit la incluzionarea virusului matur,

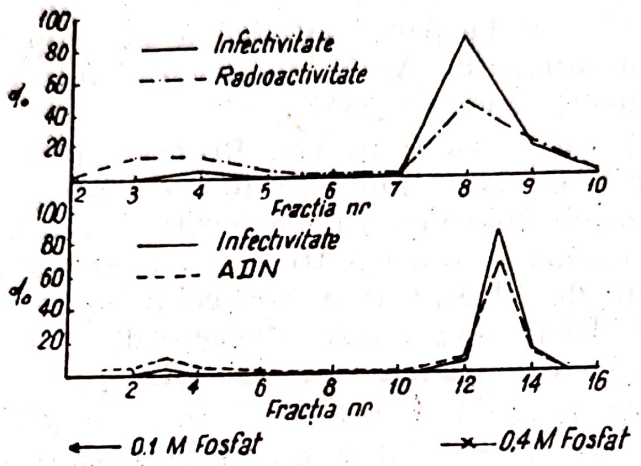


Fig.16. — Infectivitatea, conţinutul în ADN şi radioactivitatea eluatelor pe coloană de bruşhită (procentaje faţă de eluatul total). Russell, 1962.

are calitatea de a se fixa şi prezerva acidul nucleic, fapt de altfel explicat prin densitatea mult mai mare a nucleoidului cu această metodă de incluzionare. După Wildy şi colab., s-ar părea totuşi că nucleoidul este mult mai mare decît volumul pe care l-ar ocupa acidul nucleic singur, dacă se ţine seama de faptul că Powell (38) a demonstrat că volumul radiosensibil al virusului este echivalent cu o sferă al cărei diametru este de 380 Å.

Aceasta presupune că ADN din corpusculul herpetic ar fi combinat cu un alt material. Totuşi incluzionarea în aquon i-a arătat lui Epstein că dimensiile nucleoidului corespund cu diametrul zonei radiosensibile a lui Powell.

Ben-Porat şi Kaplan (2) studiază apoi compoziţia chimică a herpesului simplex (tulpina H_4) şi a virusului pseudorabic, cultivate pe celule renale de iepure ce conţin un mediu marcat cu P^{32}, şi ajung la concluzia că infectivitatea ambelor virusuri este conţinută în fracţiunea dezoxiribonucleică (fig. 17), iar compoziţia de bază a ambelor virusuri este aceeaşi : conţinutul în guanină şi citozină al ADN viral este mult mai mare (74 mol.%) decît acela al ADN celular (44 mol.%).

Cercetările lui Russell şi Crawford (44) au dovedit că ADN-ul virusului herpetic conţine guanină şi citozină în proporţie de 68% şi că el are o structură bicatenară cu o greutate moleculară de 50 000 000 — 60 000 000.

După Levington (28), ADN se sintetizează la 4 ore de la inocularea virusului herpetic şi conţine 74% guanină şi citozină. Dacă la 3 ore după inocularea virusului se administrează puromicină, sinteza ADN-ului este împiedicată.

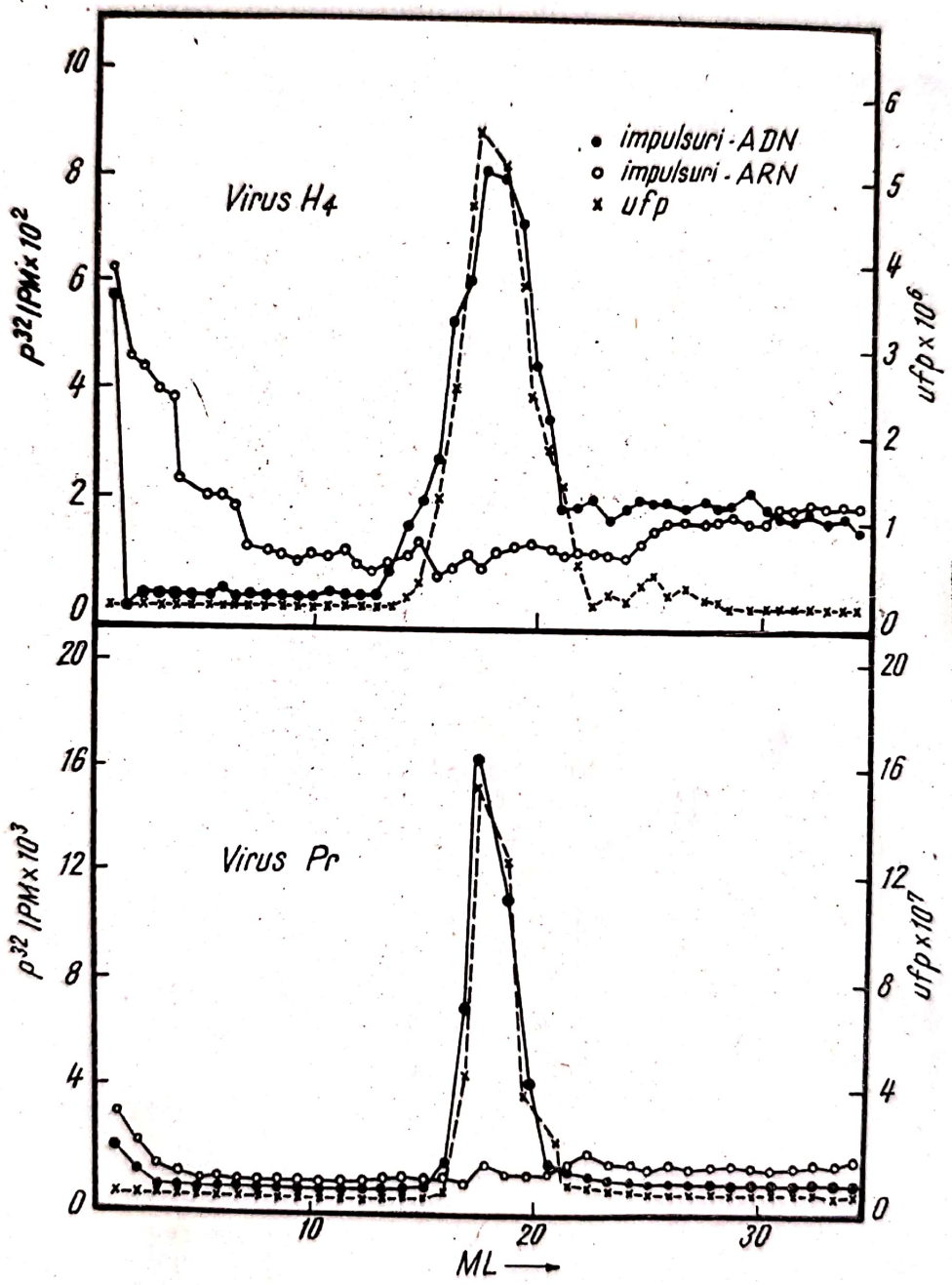


Fig. 17. — Virusul pseudorabic (tulpina Pr) şi virusul herpetic *simplex* (tulpina H_4) tratate cu P^{32} şi centrifugate apoi în gradient de densitate. Se constată paralelismul între infectiviate şi impulsurile fracţiunii ADN. Pentru ambele virusuri, după centrifugare, infectivitatea este de aproximativ 20%. Ben-Porat şi Kaplan, 1962.

5. CORPUSCULI ELEMENTARI INFECTANȚI ȘI NEINFECTANȚI

Pirie (37) consideră că particula de virus herpetic, pentru a fi infectantă, trebuie să aibă un înveliș.

Folosind tehnica contrastului negativ, Wildy, Russell și Horne (57) diferențiază pe preparatele lor microscopice particule goale (lip-

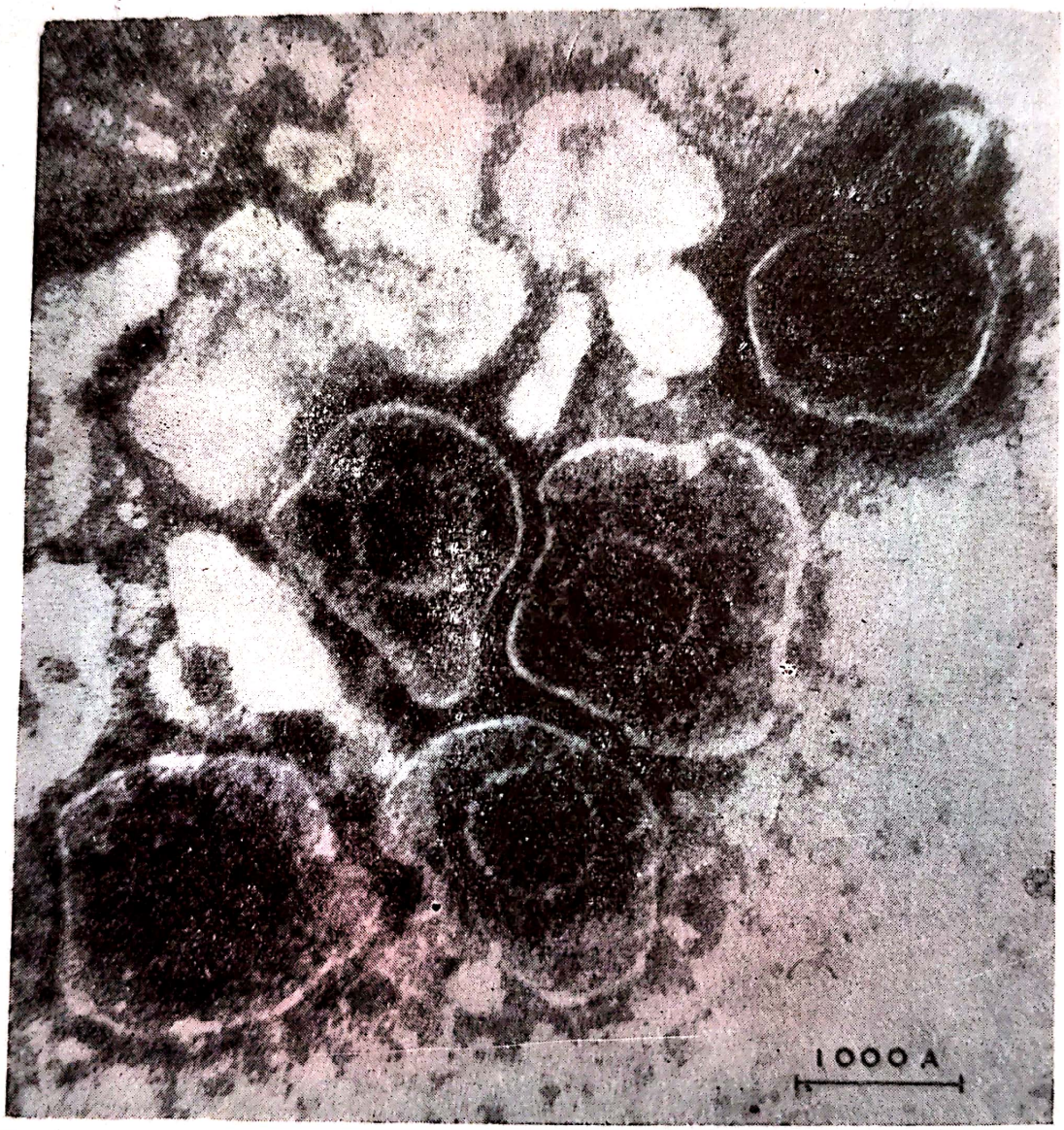


Fig.18. — Preparat obținut după amestecul serului anticelule HeLa cu virusul herpetic *simplex* cultivat în celule HeLa. Se observă prezența de particule virotice cu învelișuri aliniate între ele la o distanță de aproximativ 200 Å. Watson și Wildy, 1963.

site de nucleoidul central), cu o simetrie axială cubică, și particule fără înveliș, ambele socotite de autori ca fiind probabil particule virotice incomplete și deci neinfectante.

Scanned with OKEN Scanner

Studiind proprietăţile serologice ale particulelor cu şi fără înveliş Watson şi Wildy (55) conchid că învelişul şi capsida nu posedă antigene comune, prima fiind formată din materialul celulei gazde (fig. 18), în timp ce capsida conţine antigen specific virusului. De altfel, Epstein (10) constată electronooptic că învelişul corpusculului elementar herpetic are aceeaşi structură cu membrana celulei gazdă.

Fără a avea date precise, Watson şi Wildy (55) sugerează faptul că infectivitatea particulei virale nu ar ţine în mod esenţial de învelişul său.

S-a constatat însă de către Holmes şi Watson (18) că particulele cu înveliş sînt rapid absorbite de celule.

În cercetările sale Smit (47) observă acelaşi fenomen, ca şi Holmes şi Watson fapt care-l determină să considere că particulele cu înveliş ar avea relaţie cu infectivitatea. Înlăturînd, prin tratare cu eter, particulele cu înveliş din suspensia apoasă de virus, autorul constată o diminuare a titrului infectivităţii, însă fără alterarea evidentă a structurii fine a particulelor fără nucleoid. Căutînd să dovedească dacă particulele fără nucleoid sînt sau nu infectante, Smith (47) utilizează pentru separarea lor metoda sedimentării în gradient de densitate de clorură de cesiu, descrisă de Roizman şi Roane (41).

Cu această ocazie autorul constată că fracţiunile care conţin particule fără înveliş sînt lipsite de infectivitate, în timp ce fracţiunile ce conţin celelalte particule sînt foarte infectante, ceea ce dovedeşte că infectivitatea particulei virotice de herpes *simplex* este în mod cert legată de învelişul său care, după Watson şi Wildy (55), derivă numai din materialul celulei gazdă.

Smith discută cu ocazia acestui studiu rolul protector pe care-l joacă acest înveliş faţă de diverşii factori (nucleaze, enzime proteolitice etc.), care au acţiune distructivă sau inactivantă asupra virusului.

6. MODUL DE FORMARE A CORPUSCULULUI ELEMENTAR

În 1953, Morgan, Ellison, Rose şi Moore (29), examinînd electronooptic preparatele de membrană corioalantoidă infectate cu virusul herpetic *simplex*, pun în evidenţă prezenţa unor formaţiuni corpusculare intranucleare de dimensii variate, unele cu un diametru de 40 — 60 mμ, altele chiar pînă la 130 mμ. În citoplasmă sau în afara celulelor autorii observă aceleaşi formaţiuni corpusculare, însă de dimensiuni mult mai mari, ele ajungînd chiar pînă la 250 mμ. Din rezultatele acestor cercetări autorii conchid că dezvoltarea virusului începe în nucleul celulelor ectodermice ale membranei corioalantoide şi se completează în citoplasmă.

Puţin mai tîrziu, aceiaşi autori (30) inoculează virusul herpetic (tulpina HRE) pe membrana corioalantoidă, fixează fragmentele de membrană, recoltate după 24 — 72 de ore de la infectare în tetraoxid de os-

Scanned with OKEN Scanner

miu tamponat la pH 7,4 şi le incluzionează în metacrilat. Examenul electronooptic al secţiunilor ultrafine, umbrite cu paladiu, a pus în evidenţă prezenţa a numeroase celule ectodermice cu nucleu uşor mărit de volum şi cu comasarea substanţei reticulare la periferia membranei nucleare („marginaţie cromatiniană").

Fig. 19. — Membrană corioalantoidă infectată cu virus herpetic *simplex*. În nucleul celulei se observă 5 grămezi constituite fiecare din corpusculi elementari cu o dimensie de 50—60 mμ. Morgan, Ellison, Rose şi Moore, 1954.

În faza precoce a infecţiei, în interiorul acestei „cromatine marginate" sau adiacent ei, autorii observă prezenţa unor formaţiunii corpusculare de formă sferică, cu diametru între 40 şi 60 mμ, dense la electroni şi aranjate sub formă de grămezi (fig. 19). Prin localizarea lor, aceste grămezi dau impresia unei înlocuiri a substanţei fundamentale reticulare, sugerînd că materialul reticular ar contribui la formarea particulelor corpusculare.

Scanned with OKEN Scanner

În faza mai tardivă a infecţiei, modificările celulare sînt mult mai accentuate, observîndu-se chiar ruperea membranei nucleare; sînt prezente în interiorul nucleului numeroase formaţiuni corpusculare cu un diametru de 70 — 100 mμ sau chiar mai mari (100 — 130 mμ), însă niciodată peste această dimensie. Corpusculi de dimensii mari, atingînd uneori un diametru de 200 mμ, apar numai intracitoplasmic; totuşi, în citoplasmă se observă şi particule mai mici cu un diametru între 60 şi 100 mμ, însă totdeauna localizate în imediata vecinătate a membranei nucleare şi nu în altă parte a citoplasmei celulare.

Pe secţiuni ultrafine, examinate direct, fără umbrire cu paladiu, Morgan şi colab. constată, pe lîngă modificările nucleare evidenţiate pe preparatele umbrite cu paladiu, prezenţa unor aglomerări de mici particule (30 — 40 mμ) diferenţiate sub forma unor corpi centrali primari, denşi la electroni şi localizaţi adiacent sau în interiorul reticulului nuclear. După autori, aceşti corpi ar reprezenta primul stadiu al dezvoltării virusului.

Pe preparatele examinate la o mărire mai mare, autorii pun în evidenţă în interiorul nucleului existenţa de particule formate dintr-un corp central cu diametrul de 40 — 50 mμ (care pare mai puţin dens la electroni decît corpul central primar), înconjurat de o membrană groasă de 6 — 8 mμ şi cu un diametru de 70 — 80 mμ. Unele din particule au această membrană exterioară de aspect incomplet, ceea ce a sugerat autorilor ideea că ea s-ar forma în mod progresiv.

Particulele localizate intracitoplasmatic sau în spaţiile extracelulare, cu un diametru între 110 şi 130 mμ, sînt formate dintr-un corp central, cu densitate scăzută la electroni, înconjurat de o dublă membrană.

Absenţa aparentă a particulelor virotice intranucleare cu dublă membrană în jur şi prezenţa lor în interiorul citoplasmei, concomitent cu ruperea membranei nucleare a sugerat autorilor ipoteza că virusul capătă cea de-a doua membrană, adică se maturizează, în citoplasmă, după eliberarea lui din nucleu.

Pe secţiuni ultrasubţiri de celule renale de mainuţă infectate cu virusul herpetic B, Reissig şi Melnick (39) observă în interiorul nucleului şi al membranei duble ce-l înconjoară particule virotice cu două membrane în jur. Ulterior, aceste date au fost confirmate şi de Stoker, Smith şi Ross (48) pe secţiuni ultrafine de culturi celulare infectate cu virusul herpetic *simpex* (tulpina HFEM). Cu această ocazie, autorii pun în discuţie ipoteza formării celei de-a doua membrane a particulei virotice printr-un mecanism de invaginare a membranei nucleare.

Din rezultatele acestor 3 grupuri de cercetători reies însă două fapte concordante şi anume: *a*) că virusul herpetic se formează în interiorul nucleului celulei infectate, avînd aspectul unui corp central înconjurat de o membrană şi *b*) că virusul matur extracelular, de dimensii mult mai mari, are în mod aparent două membrane limitante.

Scanned with OKEN Scanner

Mecanismul prin care particula virotică capătă cea de-a doua membrană nu a fost însă privit în mod unitar de către Morgan şi colab. şi Stoker şi colab.

Fig. 20. — În interiorul nucleului unei celule se găsesc grămezi de granule, cu dimensii şi forme variate. Se constată repartizarea neregulată a matricei nucleare. Morgan, Rose, Holden şi Jones, 1959.

Recent, Morgan şi colab. (32) reiau în studiu această problemă. Infectează de astă dată celule HeLa şi celule amniotice umane cu un virus herpetic *simplex* (tulpina J. M.) care s-a dovedit capabil de a cristaliza

Scanned with OKEN Scanner

(31) în mod identic cu adenovirusurile şi studiază cu ajutorul microscopului electronic secţiuni ultrasubţiri obţinute din preparatele incluzionate în metacrilat, după fixare în tetraoxid de osmiu sau formalină izotonică (pH 7,4).

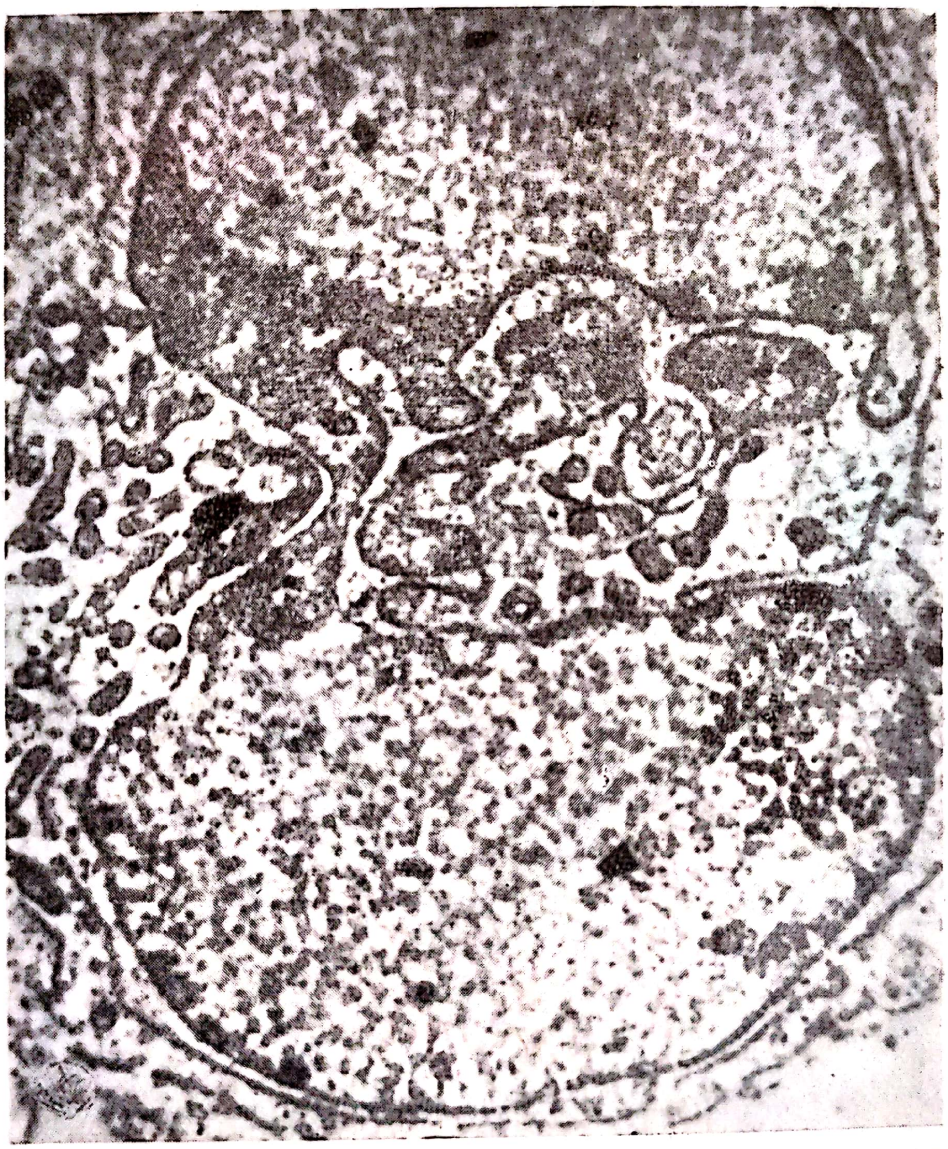


Fig. 21. — Nucleul unei celule în care se observă cromatina marginată şi un număr mic de particule virale cu o singură membrană în jur. În dreapta jos, granule dense. Morgan, Rose, Holden şi Jones, 1959.

Ca modificări celulare, autorii observă nucleii măriţi de volum (fig. 20), uneori neregulaţi ca formă (fig. 21), cu matricea nucleară dispusă adiacent membranei nucleare, de aspect dublu.

Concomitent, autorii constată prezenţa de granule dense şi ovale cu dimensii de aproximativ 20 mμ, aranjate sub forma unor aglomerate

Scanned with OKEN Scanner

la periferia nucleului, lîngă membrana nucleară, şi de filamente de diverse grosimi. Pe unele secţiuni, la un grosisment mai mare aceste granule apar aranjate sub forma unor şiruri scurte, drepte sau curbate, care pe alocuri au o orientare paralelă. Printre aceste granule se află particulele virotice constituite dintr-un corp central dens la electroni, cu un diametru de

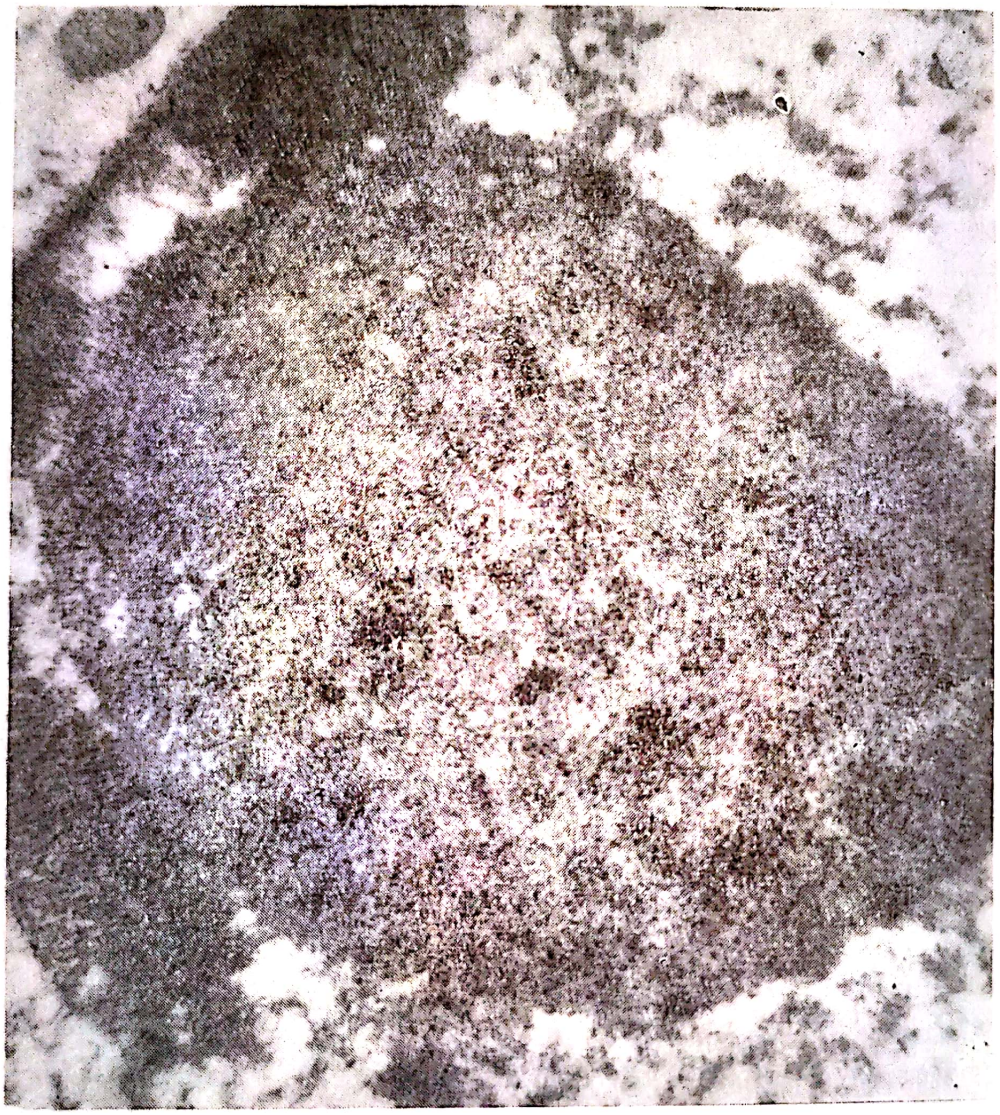


Fig. 22. — Agregat format din granule aproape uniforme care pe alocuri par aranjate liniar. Se observă particule virale cu nucleoid şi o singură membrană în jur. Morgan, Rose, Holden şi Jones, 1959.

40 mμ, înconjurat de o membrană cu diametrul de 70 — 80 mμ, care are uneori un aspect discontinuu, deci incompletă, sugerînd o dezvoltare progresivă a ei (fig. 22).

Pe alte secţiuni, particulele virotice din aceste aglomerate de granule sînt dispuse în grupuri mici care dau aspectul unei orientări cristaline

Scanned with OKEN Scanner

(fig. 23) identice cu cele observate la adenovisuri. Aceste particule grupate au, spre deosebire de particulele risipite, un corp central mai mare, cu o densitate mai redusă la electroni.

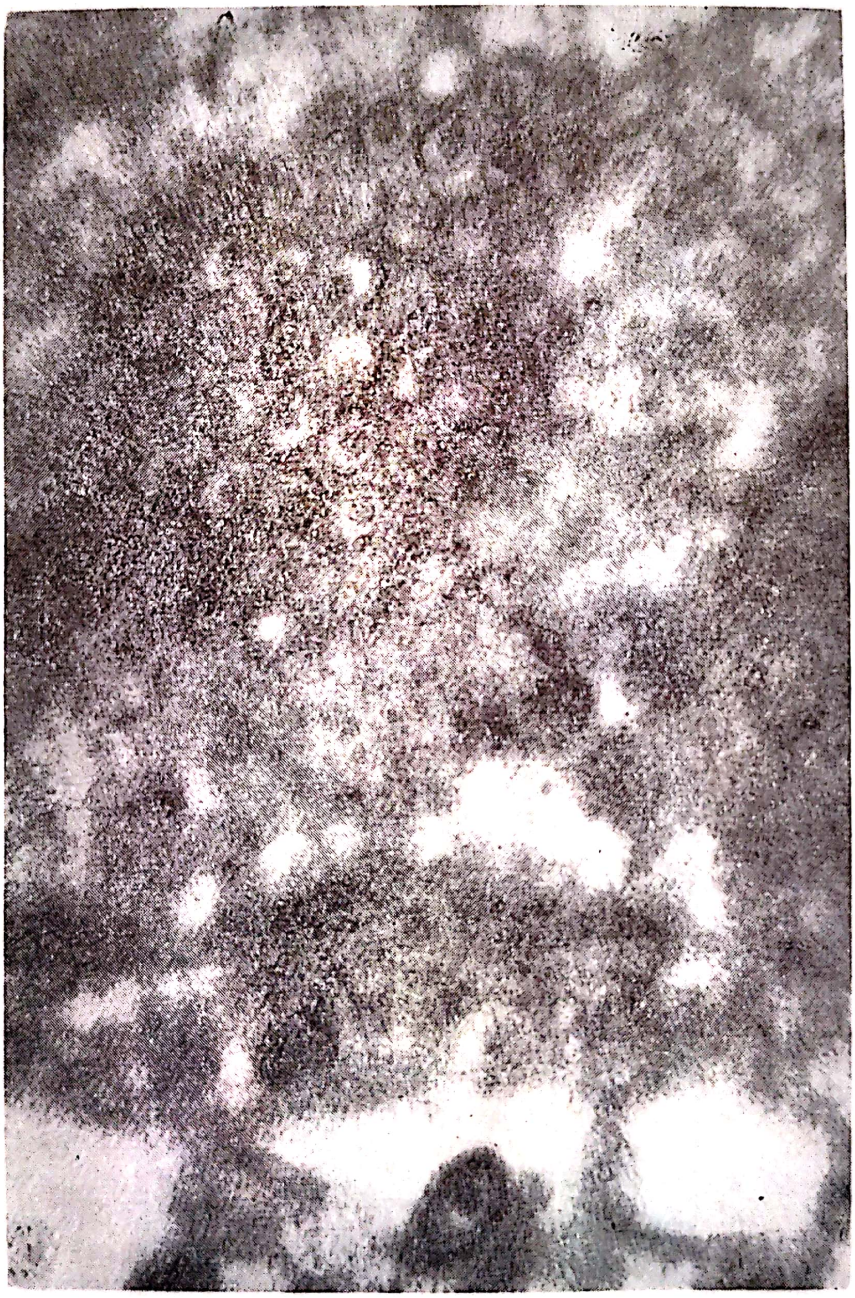


Fig. 23.—Corpusculi elementari virotici aranjaţi sub formă cristalină în interiorul nucleului celulei. Morgan, Jones, Holden şi Rose, 1958.

Tot în nucleu, autorii constată prezenţa de particule virotice cu două membrane în jur, risipite în matricea nucleară şi între membranele de la periferia nucleului. Mai rar au fost observate şi particule cu 3 mem-

Scanned with OKEN Scanner

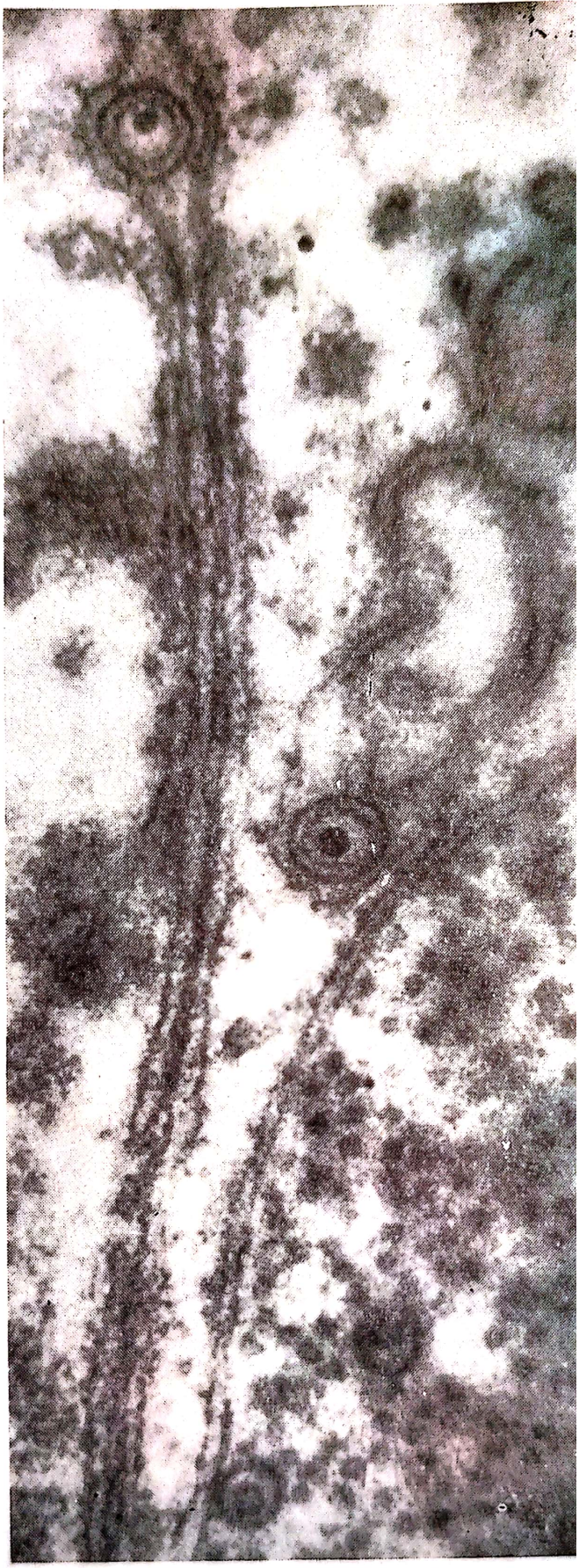


Fig. 24. — Imagine electronooptică în care se observă particule virale între membranele nucleare ce traversează vertical cîmpul microscopic. În centru o vacuolă citoplasmică în interiorul căreia se află o particulă virală. În dreapta jos, nucleul cu granule și particule de virus cu o singură membrană în jur. Morgan, Rose, Holden și Jones, 1959

Scanned with OKEN Scanner

brane în jur, cea exterioară fiind direct legată de membranele nucleare limitante.

Prezența particulelor virotice cu două membrane nu a fost observată niciodată în aglomeratele de granule sau în aranjamentele cristaline. Acest fapt a sugerat autorilor ideea că particula virotică formată din corpul său central înconjurat de o singură membrană se diferențiază și cristalizează în *zona matrice*, corespunzătoarea aglomeratelor de granule, pe cînd cea de-a doua membrană ar lua naștere într-un alt punct din nucleu, îndepărtat de această zonă matrice, înainte ca virusul să fie eliberat din nucleu. După acești autori, virusul trece din nucleu în citoplasmă fie odată cu ruperea membranei nucleare, fie fără ca aceasta să fie observată, fenomenul producîndu-se printr-un mecanism de dedublare a acestei membrane (fig. 24).

În citoplasmă, particulele virotice solitare sau în grupuri mici sînt localizate în interiorul unei vacuole (fig. 25) ai cărei pereți ar avea — după acești autori — aceeași structură ca și membranele care înconjură virusul înainte sau în timpul eliberării lui din nucleu.

Eliberarea virusului în spațiul extracelular (fig. 26) se produce printr-un fenomen de deschidere a acestor vacuole îndată ce ele ajung la suprafața celulei.

Datele obținute de Morgan și colab. cu ocazia acestui studiu, cît și cele rezultate din reexaminările microfotografiilor obținute din preparatele de membrane corioalantoide infectate cu tulpina HR de virus herpetic *simplex* i-au făcut pe autori să conchidă că virusul herpetic se dezvoltă complet în interiorul nucleului.

Utilizînd o tehnică de lucru aproape identică cu aceea a lui Morgan și colab., dar făcînd incluzionarea într-un amestec 8/2 de butil-metil metacrilat și colorînd cupele 15 minute în soluție de acetat de uranil, Falke, Siegert și Vogell (13) și Siegert (46) constată în nucleu atît prezența particulelor de virus incomplete, adică lipsite de cea de-a doua membrană cu un diametru de 100 mμ, cît și cea a particulelor complete, cu două membrane în jur, cu dimensii cuprinse între 150 și 170 mμ. După acești autori, cea de-a doua membrană a corpusculului elementar se formează în nucleu din lamelele membranei sale interne, așa încît particulele de virus care trec în citoplasmă sînt particule complete.

Fazele de dezvoltare a virusului herpetic *simplex* au fost studiate electronooptic și de Tardini și colab. (51) pe preparate de celule renale de iepure infectate cu o tulpină izolată de la un individ cu keratită herpetică. Din examenul microfotografiilor obținute autorii conchid că prima fază de dezvoltare a virusului are loc în interiorul nucleului. În fazele următoare, autorii găsesc intracitoplasmic prezența de particule cu o dublă membrană și niciodată particule cu o singură membrană.

Gaylord (15) pune însă în evidență în citoplasma celulelor infectate particule de virus cu o singură membrană și nicidecum particule cu duble membrane, ca ceilalți autori.

Scanned with OKEN Scanner

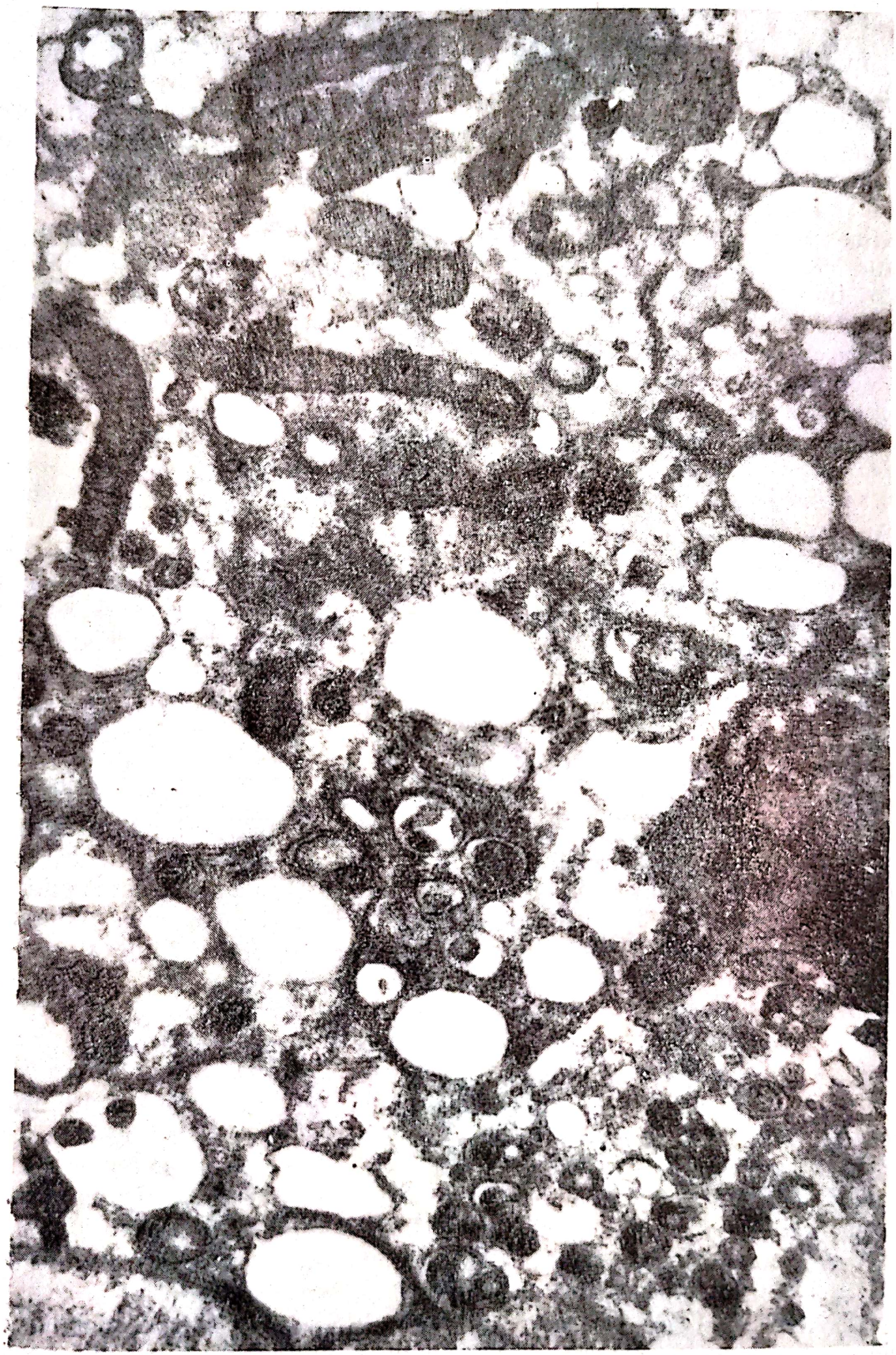


Fig. 25. — Celulă în citoplasma căreia se constată particule virale, majoritatea situate în interiorul vacuolelor. Morgan, Rose, Holden şi Jones, 1959.

Scanned with OKEN Scanner

Epstein (9) observă însă în citoplasma celulelor HeLa infectate cu virusul herpetic (tulpina HFEM) şi prezenţa de particule virotice imature, fapt care nu pare a fi în concordanţă cu datele cunoscute din studiile autorilor mai sus-citaţi. Pentru a elucida cunoaşterea ciclului de dezvoltare

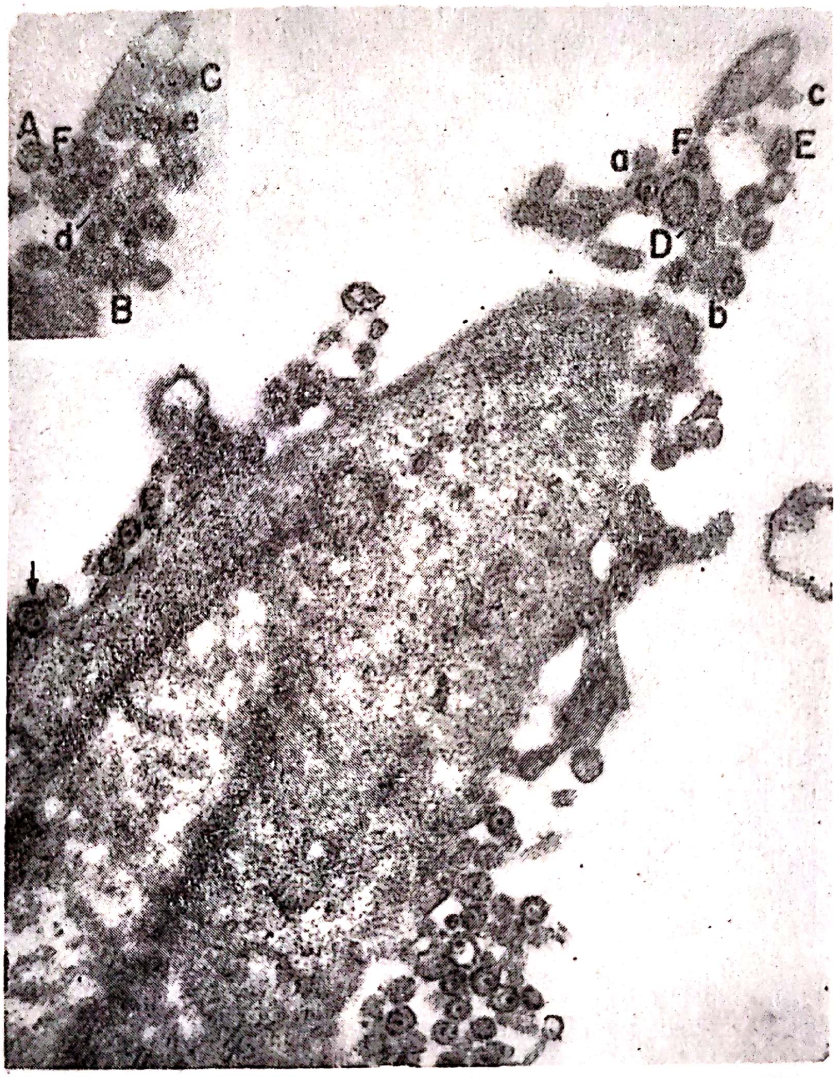


Fig. 26. — Celulă la suprafaţa căreia se observă particule virale, multe din ele cu membrana din jur neregulată. În stînga (→) sînt prezente două particule virale cu cîte o singură membrană în jur, ambele cu înveliş. În microfotografia de sus, ce reprezintă o porţiune a aceleiaşi secţiuni, este indicat cu litere mari virusul secţionat central. Morgan, Rose, Holden şi Jones, 1959.

a virusului herpetic, autorul întreprinde cercetări electronooptice asupra stadiilor citoplasmice şi a mecanismului prin care virusul matur iese din celulă.

Pe secţiuni ultrasubţiri obţinute din preparatele de celule HeLa recoltate după 2 — 3 zile de la inoculare şi incluzionate în metacrilat

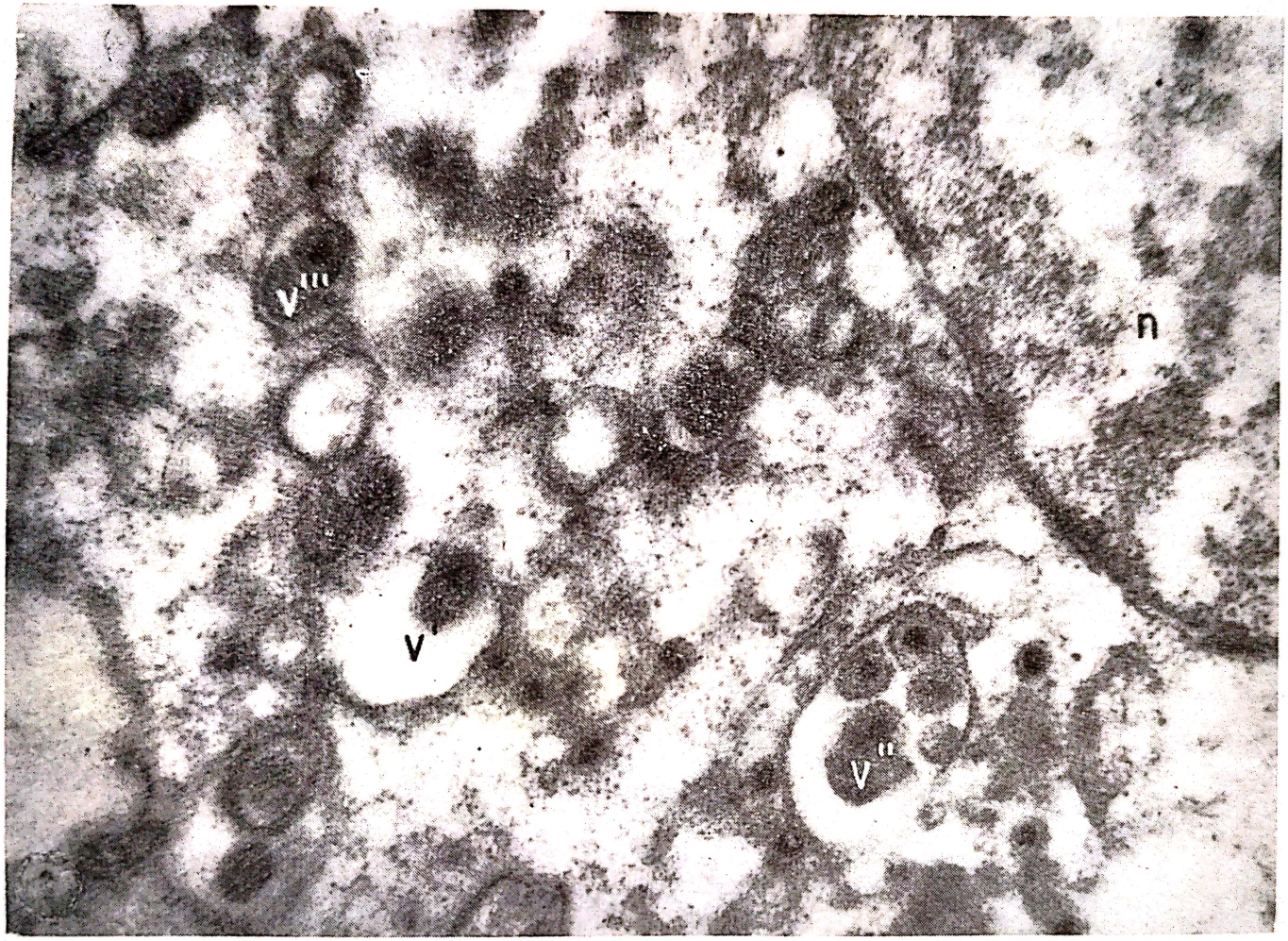


Fig. 27. — Imagine electronooptică în care este cuprins nucleul şi citoplasma celulei. Se constată în nucleu prezenţa particulelor imature de virus; aceleaşi particule imature de virus apar şi în citoplasmă, în interiorul vacuolelor (*v'* şi *v''*); în interiorul unor vacuole se află însă particule de virus matur (*v''* şi *v'''*). Epstein, 1962.

după fixare în tetraoxid de osmiu sau permanganat de K, autorul observă în nucleu, pe lîngă particulele formate dintr-un nucleoid dens înconjurat de o singură membrană limitantă, aranjate fie sub formă cristalină fie sub formă de mase corpusculare risipite neomogen, prezența particulelor cu dublu înveliș, așezate în apropierea membranei nucleare.

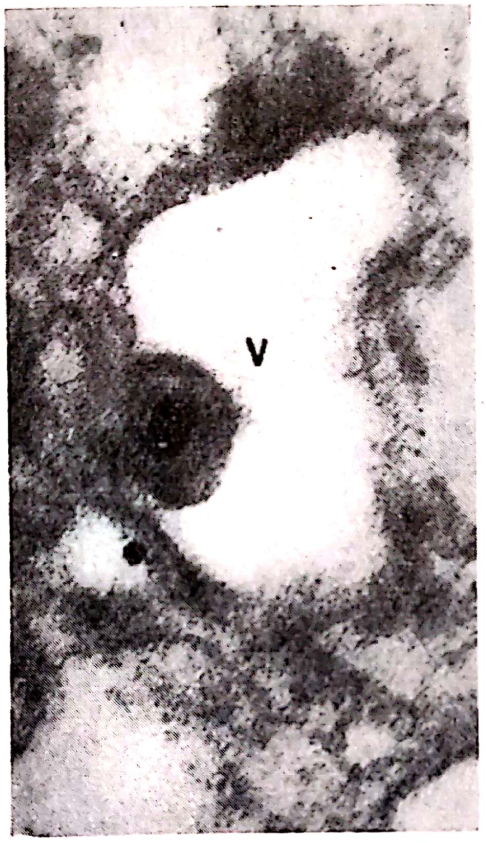


Fig. 28. — Particulă virală în interiorul unei vacuole citoplasmice (*v*), înconjurată de o membrană vacuolară. Epstein, 1962.

Particulele intracitoplasmice cu o singură membrană, identice cu cele din interiorul nucleului, au fost observate de autor în vecinătatea vacuolelor citoplasmice, unele din ele fiind înconjurate parțial sau în întregime de membrana vacuolei, dînd aspectul unei înglobări în interiorul vacuolei (fig. 27). Aceste particule nu se pot deosebi din punct de vedere structural de formele mature de virus. Mecanismul prin care virusul imatur iese din nucleul intact în citoplasmă rămîne încă obscur.

Pe preparatele fixate în permanganat, autorul observă că tripla membrană din jurul particulei virotice este identică din punct de vedere structural cu aceea a membranei vacuolare și cu aceea a membranei celulare (fig. 28).

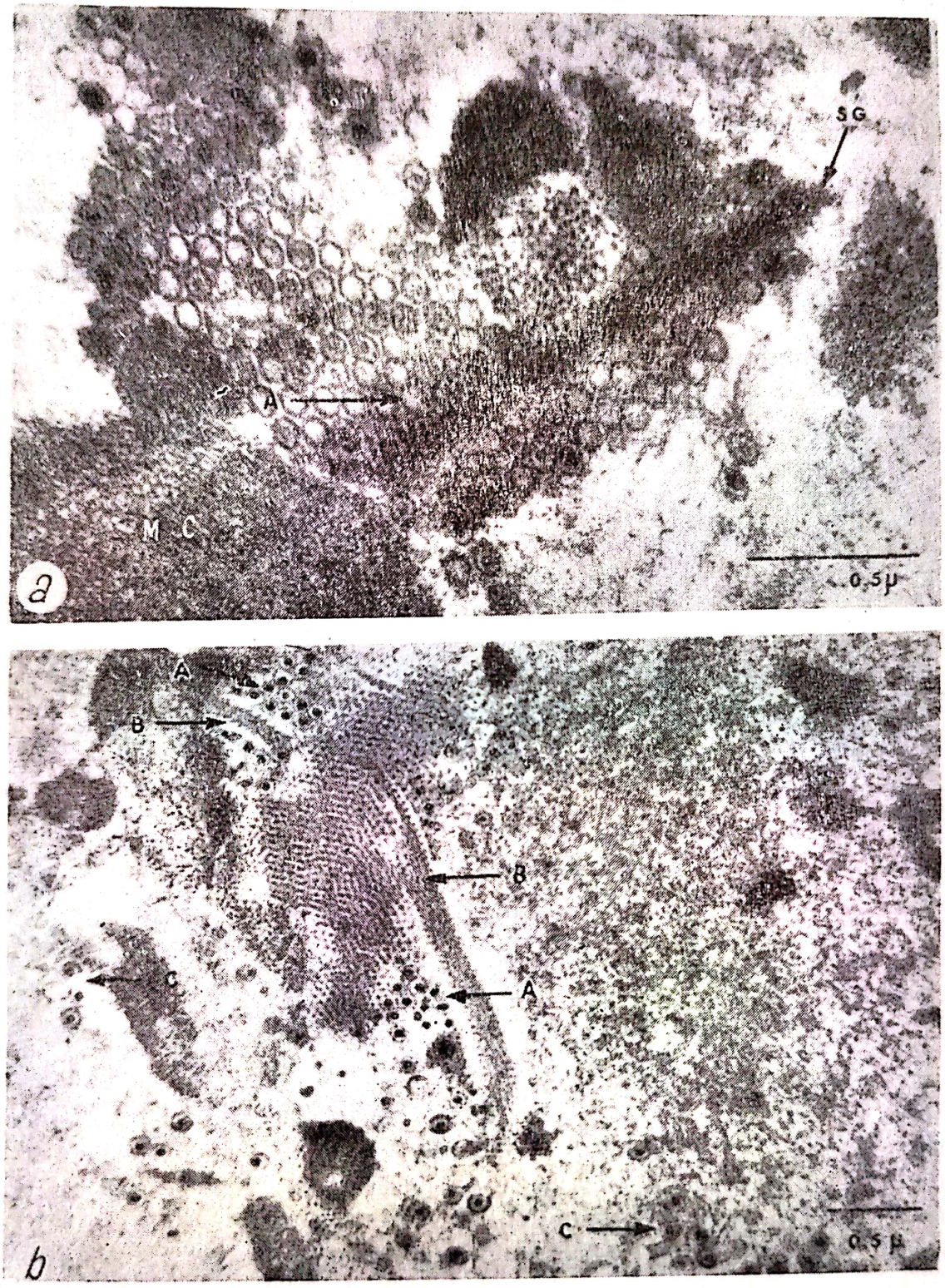


Fig. 29. — Celule amniotice umane FL, 46 de ore de la infectarea lor cu virus herpetic *simplex* şi tratate cu p-fluorofenilalanină.

a. Apariţia şi unirea subunităţilor virale.

b. Stadiile de dezvoltare virală. Chitwood şi Bracken, 1964.

Scanned with OKEN Scanner

Prezența vacuolelor în directă legătură cu aparatul Golgi (componentă a reticulului endoplasmic) ar sugera, după autor, că ele s-ar forma mai degrabă prin dilatări ale acestei structuri decît, așa cum conchid Morgan și colab. (32) și Falke și colab. (13), din învelișul nuclear sau din invaginarea membranei celulare.

Eliberarea virusului în spațiul extracelular s-ar putea face după autor printr-o deschidere în momentul fuzionării pereților vacuolei cu membrana celulei.

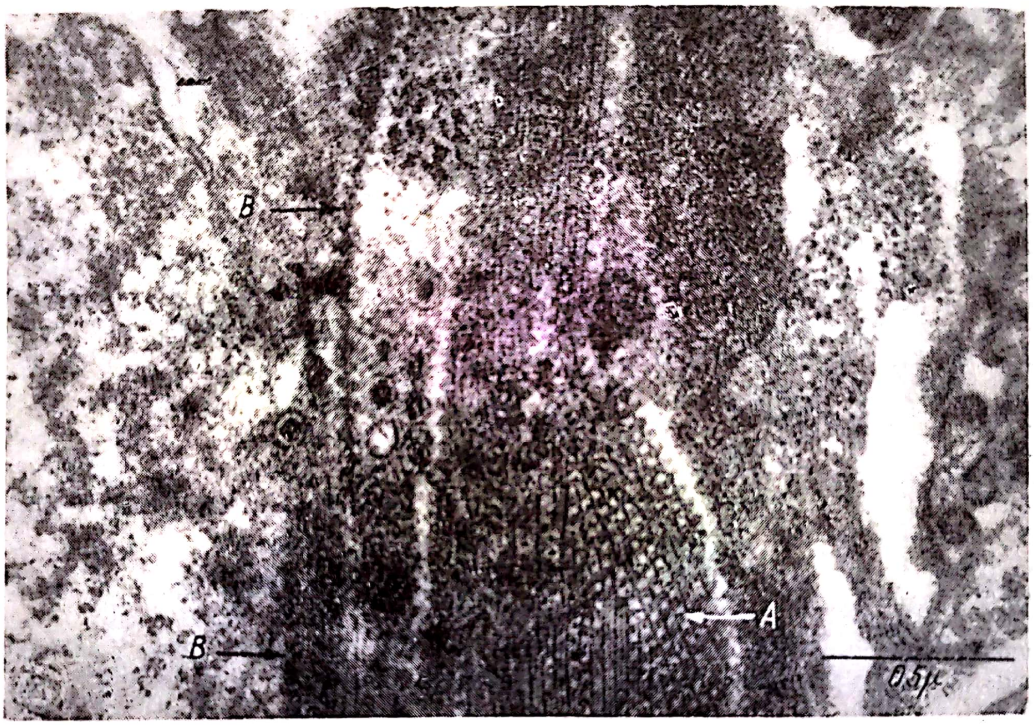


Fig. 30. — Celule amniotice umane FL, 46 de ore de la infectarea lor cu virus herpetic *simplex* și tratate cu p-fluorofenilalanină. Se observă prezența structurilor fibrilare și „diplozomii". Chitwood și Bracken, 1964.

Studiile lui Chitwood și Bracken (5) asupra formelor intermediare ale virusului au evidențiat faptul că celulele FL tratate cu p-fluorofenilalanină și fenilalanină în concentrații variate și apoi infectate cu virus herpetic *simplex* prezintă după 46 de ore de la instituirea inoculului mase intranucleare formate de granule sferice de 16 mμ în diametru, care dau impresia că iau naștere din cromatina marginată, și particule sferice mari cu o singură membrană în jur, care de asemenea par a deriva din masa adiacentă de cromatină (fig. 29); aceste particule sînt aranjate sub formă cristaloidă, separate de fibrile liniare formate din subunități sau „diplozomi" aranjați regulat și limitați longitudinal de fibrile (fig. 30). Aceste fibrile sînt asociate cu corpusculi sferici.

BIBLIOGRAFIE

1. Basset, J., Nicolau, S., Macheboeuf, M. A. — C.R. Acad. Sci., 1935, *200*, 1882.
2. Ben-Porat, T., Kaplan, A. S. — Virology, 1962, *16*, 261.
3. Brenner, S., Horne, R. W. — Biochem. Biophys. Acta, 1959, *34*, 103.
4. Caspar, D. L.D. — Nature, 1956, *177*, 475.
5. Chitwood, L.A., Bracken, E. C. — Virology, 1964, *24*, 116.
6. Crick, F. H. C., Watson, J. D. — Nature, 1956, *177*, 473.
7. Crouse, V. H., Coriell, L. L., Blank, H., Scott, T. F. Mc N. — J. Immunol., 1950, *65*, 119.
8. Doerr, C. — Zbl. Haut. Geschlectskr., 1924, *13*, 417; *15*, 1 şi 289; *16*, 481.
9. Epstein, M. A. — J. Cell Biol., 1962, *12*, 589.
10. Epstein, M. A. — J. exp. Med., 1962, *115*, 1.
11. Epstein, M.A. — Nature, 1962, *194*, 116.
12. Epstein, M. A., Holt., S. J. — J. Cell Biol., 1963, *19*, 2.
13. Falke D., Siegert, R., Vogell, W. — Arch. ges. Virusforsch., 1959, *9*, 484.
14. Gastinel, P., citat de S. Nicolau în *Les ultravirus des maladies humaines*; Levaditi C. şi Lépine P., Maloine, Paris, 1938, p. 297.
15. Gaylord, W. H. Jr. — Virology, 1960, *10*, 271.
16. Gibbons, J. R. — Nature, 1959, *184*, 375.
17. Herzberg, K. — Klin. Wschr., 1934, *13*, 1363.
18. Holmes, I. H., Watson, D. H. — Virology, 1963, *21*, 112.
19. Horne, R. W. — Sci. amer., 1963, *208*, 48.
20. Horne, R. W., Brenner, S., Waterson, A. P., Wildy, P. — J. mol. Biol., 1959, *1*, 84.
21. Horne, R. W., Nagington, J. — J. mol. Biol., 1959, *1*, 333.
22. Horne, R. W., Waterson, A. P., Wildy, P. — Virology, 1960, *11*, 79.
23. Kaplan, A. S., Ben-Porat, T. — Virology, 1959, *8*, 352.
24. Kaplan, A. S., Ben-Porat, T. — Virology, 1961, *13*, 78.
25. Laudo, D., Rudder, Y., Privat de Garilhe, M. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, *47*, 1033.
26. Lépine, P. — *Technique de laboratoire en virologie humaine*, Masson, Paris, 1965, p. 345.
27. Levaditi, C., Nicolau, S. — C. R. Acad. Sci., 1923, *176*, 717.
28. Levington, L. — Rev. Biochem., 1965, *34*, 487.
29. Morgan, C., Ellison, S. A., Rose, H. M., Moore, D. H. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1953, *82*, 454.
30. Morgan, C., Ellison S. A., Rose, H. M., Moore, D. H. — J. exp. Biol. Med., 1954, *100*, 195.
31. Morgan, C., Jones, E. P., Holden, M., Rose, H. M. — Virology, 1958, *5*, 568.
32. Morgan, C., Rose, H. M., Holden, M., Jones, E. P. — J. exp. Med., 1959, *110*, 643.
33. Naegeli, O. — Schweiz. med. Wschr., 1926, *56*, 25.
34. Newton, A. A., Stoker, M. G.P. — Virology, 1958, *5*, 549.
35. Nicolau, S., Kopciowska, L. — C. R. Soc. Biol., 1937, *204*, 1276.
36. Nicolau, S., Kopciowska, L. — Ann. Inst. Pasteur, 1938, *60*, 401.
37. Pirie, N. W. — Material in virus preparation not necessary for manifestation of characteristic properties. Ciba Foundation Symp. Nature Viruses, 1957, 56.
38. Powell, W. F. — Virology, 1959, *9*, 1.
39. Reissig, M., Melnic, J. L. — J. exp. Med., 1955, *101*, 341.
40. Roizman, B. — Virology, 1961, *13*, 387.
41. Roizman, B., Roane Jr. P. R. — Virology, 1961, *15*, 175.
42. Ross, R. W., Orlans, E. — J. Path. Bact., 1958, *76*, 393.
43. Russell, W. C. — Virology, 1962, *16*, 355.
44. Russell, W. C., Crawford, L. V. — Virology, 1963, *21*, 353.
45. Russell, W. G., Watson, D. H., Wildy, P. — Biochem. J., 1963, *87*, 26.
46. Siegert, R. — Wien. Z. Nervenheilk. Grenzg., 1960, *18*, 159.
47. Smith, K. O. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1964, *115*, 814.
48. Stoker, M.G.P., Smith, K. M., Ross, R. W. — J. gen. Microbiol., 1958, *19*, 244.
49. Tamm, Y., Bablanian, R. — J. exp. Med., 1960, *111*, 351.
50. Taniguchi, T., Hosokawa, M., Kuga, S., Masuda, Z. — Jap. J. exp. Med., 1934, *12*, 101.
51. Tardini, A., Vitali-Mazza, L., Verdi, G.P., Dossena, G. — Riv. Anat. Pat., 1960, *17*, 27.

Scanned with OKEN Scanner

52. Veratti, E., Sala, G. — Boll. Soc. Med. Chirurg. di Pavia, 1923, *36*, f. 4.
53. Wachstein, M., Meisel, E. — Amer. J. clin. Path., 1957, *27*, 13.
54. Watson, D. H., Russel, W. C., Wildy, P. — Virology, 1963, *19*, 250.
55. Watson, D. H., Wildy, P. — Virology, 1963, *21*, 100.
56. Wildy, P., Horne, R. W. — Proc. 2 d. Europ. Reg. Conf. Electr. Microsc. (Delft), 1960, 955.
57. Wildy, P., Russell, W. C., Horne, R. W. — Virology, 1960, *12*, 204.
58. Wildy, P., Smith, C., Newton, A.A., Denty, P. — Virology, 1961, *15*, 486.
59. Williams, R. C., Smith, K. M. — Biochem. Biophys. Acta, 1958, *28*, 464.

PROPRIETĂŢILE VIRUSULUI HERPETIC

1. UBICUITATEA VIRUSULUI HERPETIC

Virusul herpetic a putut fi izolat prin inocularea pe organisme sensibile a materialului provenind din orice manifestare herpetică: corneeană, mucoasă sau tegumentară, idiopatică sau simptomatică, simplă sau recidivantă; de asemenea, virusul a fost găsit în encefal sau în lichidul cefalorahidian al indivizilor morţi de encefalită letargică (57) (23) (24) (26) (73) (74) (103) (120), în lichidul cefalorahidian al bolnavilor de poliomielită (29), în nevraxul unor cazuri de encefalită postrujeoloasă (36), în creierul cazurilor de choree Sydenham (40) sau de choree acută febrilă (57), în lichidul cefalorahidian al unui caz de chorea *minor* (42) şi al unui caz de sifilis (30), în erupţiile de *Sycosis vulgaris*, în erupţia de zona zoster (74) şi în rădăcinile posterioare ale ganglionilor spinali ai regiunilor interesate de erupţie (94), în saliva indivizilor purtători de erupţii herpetice (46) (31) (88) (89) şi chiar la indivizii sănătoşi (61) (25) (111).

Această enumerare, incompletă, dovedeşte că virusul herpetic se poate afla accidental acolo unde ne aşteptăm mai puţin; ea dovedeşte *ubicuitatea* acestui germen.

2. BIOFITISMUL VIRUSULUI

În unele inframicrobioze (boala cu virus III şi encefalita postvaccinală) germenele poate exista în anumite condiţii, într-un ţesut determinat, în stare de viaţă latentă. Profitînd de un echilibru perfect stabil între rezistenţa celulei şi propria sa agresivitate îndiguită, celulele îl tolerează şi el îşi păstrează adormite proprietăţile patogene. E deajuns însă, ca datorită unor cauze variate (şoc psihic, traumatism, îmbolnăvire cu un alt germene, modificări ale terenului consecutive unei alte infecţii) rezistenţa ţesutului — în principiu sensibil — să scadă, sau ca virulenţa germenului că crească subit, sau ca sub influenţe nedefinite să se petreacă modificarea simultană a terenului şi a agresivităţii inframicrobilor, pentru

Scanned with OKEN Scanner

ca aceştia din urmă să se mobilizeze, să se multiplice, să invadeze teritoriul cu apărare scăzută şi să apară boala cu evoluţia şi cu leziunile ei caracteristice.

În ceea ce priveşte infecţia herpetică umană s-a constatat că în cazul *herpesului recidivant ritmic sezonier* modificările ce permit apariţia recidivei sînt sub influenţa încă nedefinită a „cosmosului"; în cazul *herpesului recidivant aritmic*, modificările acestea sînt datorite diferitelor cauze, dintre care traumatismul este un factor principal (herpes labial, genital), iar în *herpesul catamenial* influenţa hormonilor asupra redeşteptării germenilor şi asupra sensibilizării terenului este evidentă.

Virusul herpetic a putut fi izolat, în unele cazuri, din sistemul nervos uman în cursul diferitelor boli (encefalită letargică, encefalită posteruptivă, choree, zona zoster) sau din diferite leziuni eruptive tegumentare (zona, *Sycosis vulgaris*), fără a putea găsi *in situ* dovada activităţii sale patogene — alteraţiile citologice — pe care le produce de obicei. Virusul are o *viaţă* latentă în ţesuturile care-l adăpostesc, în saliva indivizilor normali şi în ganglionul spinal, între două recidive, la indivizi suferind de herpes.

Există totuşi o stare în care virusul nu este nici agresiv, nici în multiplicare activă şi nici patogen. E vorba tocmai de faza în care se stabileşte echilibrul între rezistenţa celulei şi agresivitatea germenului.

Un asemenea exemplu e adus de inocularea virusului herpetic în creierul de broască ţestoasă (98); s-a constatat că inframicrobul introdus in encefalul acestui animal (*Testudo mauretanica*) îşi poate păstra virulenţa timp de 30 de zile, fără să şi-o traducă prin nimic. Ţesutul nervos al acestui animal nefiind sensibil la acţiunea patogenă a virusului inoculat nu reacţionează, rămîne inert faţă de germenele pe care îl găzdueşte, îl tolerează şi nu tinde a-l distruge.

Acelaşi virus a putut fi regăsit în stare latentă şi la cobai (35), la care infecţia experimentală părea stinsă de mult timp.

McCallum, Potter şi Edwards (77) aduc observaţiile a două cazuri de meningo-encefalită la care fenomenele epileptice au durat 6 şi respectiv 12 luni după debutul clinic al bolii herpetice şi de la care s-a putut izola virusul din fragmente de biopsie corticală.

În cursul tuturor acestor circumstanţe, virusul se găsea în organism la un moment dat, în stare de germene adormit, nepatogen, neagresiv, stare omologă celei de bacterie *saprofită* şi pe care o exemplifică bine pneumococul din saliva oamenilor sănătoşi. Deoarece virusurile nu pot trăi pe „*sapros*" (substanţă moartă) ci numai pe „*bios*" (substanţă vie), în lumea virusurilor a fost utilizat termenul de „biofit" pentru a desemna starea de virus adormit, neagresiv, în analogie cu acela de „saprofit" în lumea bacteriilor (90). Nicolau şi colab. (90) au explicat această noţiune în felul următor: termenul de „saprofit" este compus din cuvîntul „*sapros*" (putrezit, mucezit, descompus, materie moartă) şi „*fiton*" (tot ce creşte,

Scanned with OKEN Scanner

vegetează); microbul saprofit ar fi, interpretînd etimologic, bacteria care trăieşte şi se multiplică pe materia moartă, organică însă neorganizată. În realitate bacteriile pot trăi şi se pot înmulţi pe medii de cultură fără viaţă, pe medii moarte. În limbajul curent s-a considerat însă sinonimă noţiunea de „saprofit" cu aceea de *nepatogen* şi azi se indică prin adjectivul „saprofit" lipsa de însuşiri patogene. Această proprietate e definitivă la unele microorganisme sau trecătoare la altele. În sensul strict al cuvîntului un germen saprofit nu are nici o manifestare patogenă, nu poate ataca şi nu poate modifica un ţesut viu. Noţiunea de „biofit" în lumea virusurilor e paralelă celei de „saprofit" în cea a microbilor.

Cuvîntul format din „*bios*" (viaţă) şi „*fiton*" (tot ceea ce vegetează, creşte) ar desemna microorganisme ce trăiesc şi cresc numai pe materie vie. Se ştie că virusurile trăiesc şi cresc numai pe medii ce conţin „viaţă", sub formă de celule vii, în organisme vii, pe materie vie. Ca şi pentru termenul de „saprofit" la bacterii, prin extensia sensului etimologic al cuvîntului, termenul de „biofit" desemnează virusul care, fără activitate patogenă, fără nici o manifestare a vitalităţii sale, vegetează în substanţa vie, în celule.

În stare de virus „biofit" se găseşte inframicrobul herpetic în ţesutul nervos între două recidive de herpes recidivant, sau în saliva omului normal.

2. FILTRABILITATEA

În 1919, Löwenstein (70), inoculînd pe corneea de iepure produsul obţinut prin trecerea suspensiei de virus herpetic în soluţie fiziologică prin bujii Berkefeld, obţine rezultate negative; acest fapt îl determină pe autor să considere că virusul herpetic nu este filtrabil.

Un an mai tîrziu, Levaditi şi Harvier (55) aduc primele date asupra filtrabilităţii virusului herpetic. Autorii inoculează intracerebral filtratul obţinut după trecerea prin bujii Chamberland L_1 şi L_2 a unei suspensii cerebrale de iepure cu encefalită herpetică şi obţin encefalita caracteristică virusului herpetic.

În 1921, autorii vienezi Luger şi Lauda (72) verifică datele lui Löwenstein asupra filtrabilităţii virusului herpetic. Autorii filtrează lichidul vezicular din herpesul labial prin bujii Nordmayer-Berkefeld, a căror porozitate fusese stabilită în prealabil cu o suspensie de pneumococi, şi încearcă să reproducă, prin inocularea produsului obţinut, keratita herpetică la iepuri. Rezultatele neconcludente i-a determinat pe autori să refacă această experienţă; utilizează de astă dată o suspensie de creier de iepure mort în urma inoculării intravenoase a lichidului vezicular din herpesul febril. Introducînd pe cale intravenoasă la iepure produsul obţinut după filtrarea suspensiei prin bujii Berkefeld, la o presiune de 230 mm apă, autorii reproduc o boală herpetică generală cu sfîrşit letal în 12 zile de la inoculare.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste cercetări, cît şi cele ale lui Levaditi şi Harvier demonstrează în mod clar că virusul herpetic din emulsiile de creier de iepure mort de nevraxită herpetică experimentală trece prin filtrele poroase Chamberland şi Berkefeld.

Blanc şi Caminopetros (12) dovedesc că virusul herpetic luat de pe corneea şi conjunctiva iepurelui şi diluat în soluţie fiziologică izotonică trece prin filtrele Chamberland L_1 şi L_3; filtratul obţinut şi inoculat la iepure pe corneea scarificată s-a dovedit a fi capabil de a determina leziuni de cheratită herpetică.

La aceleaşi concluzii ajung apoi şi alţi cercetători ca Vegni (112), Morelli (81) şi Bruni (16). Rezultatele acestor din urmă autori nu au putut fi însă confirmate de Perdrau (91). Acest autor, cercetînd porozitatea filtrelor Chamberland L_1, L_2 şi L_3 cu ajutorul unei culturi de bacili *prodigiosus*, constată că filtratul obţinut cu filtrele L_1 conţine tot atîţia germeni ca şi în suspensia iniţială şi că filtrele L_2 lasă să treacă cîteva bacterii. Acest fapt îl determină pe autor să conteste filtrele Chamberland în demonstrarea filtrabilităţii virusului herpetic şi utilizează în acest scop filtrele Massen. Făcînd examenul histopatologic al creierului de iepure inoculat intracerebral cu produsul obţinut prin trecerea suspensiei prin aceste filtre, autorul constată absenţa leziunilor specifice inframicrobului şi consideră că virusul herpetic nu e filtrabil.

Greenbaum şi Harkins (37) dovedesc că virusul filtrează însă prin filtrele Mandler.

Experienţele efectuate de majoritatea autorilor au stabilit deci că virusul herpetic filtrează. Diferenţele obţinute uneori atît în ceea ce priveşte simptomatologia cît şi leziunile anatomopatologice între animalele inoculate cu suspensie herpetică filtrată şi cele inoculate cu suspensie herpetică nefiltrată au fost puse de autori pe seama sărăcirii în germeni a suspensiei filtrate, prin aderarea corpusculilor elementari la pereţii bujiilor.

S-a arătat însă de către McCartney (78) şi Ward şi Tang (117) că filtrarea inframicrobului herpetic se realizează mai uşor dacă emulsia este suspendată în bulion.

Uneori este util ca înainte de inoculare filtratul să fie îmbogăţit printr-o concentrare prealabilă în vid (115) (76).

4. ULTRAFILTRABILITATEA

Virusul herpetic este de asemenea ultrafiltrabil. Levaditi şi Nicolau (66) au fost primii cercetători care au arătat că inframicrobul traversează membranele de colodiu. Aceste experienţe au fost deosebit de interesante, fiindcă în 1923 cunoştinţele asupra virusurilor erau foarte reduse. Se admitea că virusurile sînt enzime sau toxine. Cu prilejul lucrării lor asupra ultrafiltrabilităţii virusului herpetic, Levaditi şi Nicolau au afirmat că virusurile sînt corpusculare, constituite din agregate de materie proteică

care se comportă ca materie vie, precum şi că fiecare specie de virus are dimensiunile ei caracteristice.

Ultrafiltrarea virusului herpetic a fost ulterior confirmată de Zinsser şi Tang (123) şi de Elford, Perdrau şi Smith (28). Cu ajutorul ultrafiltrării, aceşti din urmă autori au stabilit că dimensia corpusculară a germenilor herpetici se află cuprinsă între 100 şi 150 mμ.

După Levaditi, Païc şi Krassnoff (67) dimensia virusului herpetic, calculată după aceeaşi metodă, ar fi inferioară celei constatate de autorii englezi.

5. CENTRIFUGAREA, ULTRACENTRIFUGAREA

Dimensiile reduse ale germenului împiedică sedimentarea sa în timpul centrifugării suspensiilor virulente, în aparate cu o turaţie mică (2000 — 4000 t/min). Prin centrifugări la 5000 t/min timp de 2—$2^1/_2$ ore, Bedson (6) obţine sedimentarea virusului.

S-a constatat de către Munk şi Ackerman (83) că prin centrifugare la 11 000 t/min timp de o oră, sedimentul lichidului amniotic infectant conţine 96—98% din virusul existent.

Levaditi, Harvier şi Nicolau (63) şi McCartney (78) au stabilit că centrifugarea unei suspensii cerebrale virulente nu debarasează lichidul supernatant de puterea sa patogenă.

Supus *ultracentrifugării*, virusul se depune pe fundul tubului. Această operaţie a permis lui Bechold şi Schlessinger (5) de a calcula dimensiile corpusculare a germenului (180—220 mμ).

Pentru virusul herpetic purificat, adaptat la oul de găină embrionat, există o constantă medie de sedimentare de 1178 S.

6. ELECTROFOREZA

Bedson şi Bland (8) au demonstrat în cercetările lor că virusul herpetic are punctul izoelectric între pH 7,2 şi 7,6.

Folosind emulsii virulente a căror concentraţie în ioni de hidrogen varia între pH 5,3 şi 7,8, Nicolau şi Kopciowska (85) arată că sarcina electrică negativă a germenului herpetic este cuprinsă între pH 6,6 şi 7,2. Lépine (52), studiind această problemă, constată acelaşi fenomen.

7. ADSORBŢIA

Virusul herpetic poate fi adsorbit pe diverse substanţe inerte, cum ar fi negrul animal, caolinul sau fosfatul tricalcic (65). Dacă se centrifughează amestecul virus + substanţă inertă, lichidul supernatant este avirulent,

Scanned with OKEN Scanner

în timp ce depozitul, format de pudra inertă şi virusul adsorbit, este foarte patogen.

Virusul herpetic este de asemenea adsorbit de particulele de colodiu (7) şi carmin (36).

8. DILUŢIA

Diluţia virusului herpetic diminuă puterea sa patogenă. Cantitatea de virus care conferă boala la animal variază cu tulpina şi diluţia utilizată şi cu modul de inoculare (intracerebrală sau corneeană).

Levaditi, Harvier şi Nicolau (62) au arătat că o tulpină de virus herpetic cultivată în creierul de iepure este virulentă în diluţia de 1/1 000—1/10 000 pentru encefalul aceleiaşi specii animale.

Le Fèvre de Arric (51), utilizînd o altă tulpină de virus herpetic, constată că ea este încă patogenă pentru creierul de iepure la diluţia de 1/1 000 000.

În general, pentru corneea de iepure, o diluţie de 1/100 de virus herpetic este încă virulentă (71) (22).

Suspendat în soluţie fiziologică, virusul herpetic *simplex* îşi pierde din activitatea sa patogenă, acelaşi virus în soluţie tamponată pH 7,2, în ser de iepure 10% sau ser de cal cu gălbenuş de ou 0,1%, în gelatină 0,5% sau în bulion îşi menţine un anumit timp puterea sa patogenă iniţială (47) (83) (19).

9. DIFUZIBILITATEA

Spre deosebire de alte virusuri neurotrope, Levaditi, Harvier şi Nicolau (62) au demonstrat că difuzibilitatea virusului herpetic în glicerină sau gelatină solidă este nulă.

10. PURIFICAREA

Pentru purificarea virusului herpetic, metoda cromatografiei pe coloană de fosfat de calciu (bruşită) folosită de către Taverne şi Wildy (110), Wildy, Russell şi Horne (119) şi Russell (100) cît şi centrifugarea în gradient de densitate folosită de Ben-Porat şi Kaplan (9) sînt aplicate în toate laboratoarele de specialitate, cu cele mai bune rezultate.

Cu ambele metode se obţine o purificare a virusului de 80—90%; produsul obţinut pcate fi folosit pentru determinarea infectivităţii sale, pentru studiul absorbţiei în ultraviolet şi pentru numărarea particulelor virale după tehnica lui Watson, Russell şi Wildy (118), în cazul cromatografiei pe coloană, sau pentru studiul acidului nucleic viral (Russell, 100;

Scanned with OKEN Scanner

Ben-Porat şi Kaplan, 9; Russell şi Crawford, 101), în cazul centrifugări în gradient de densitate.

Este de notat faptul că Munk şi Ackerman (83) au observat că purificatele de virus sînt stabile în apă distilată şi în sucroză 0,25 M şi instabile în lichidul alantoidian; stabilitatea virusului creşte la sau peste pH 7 în soluţii ionice.

ACŢIUNEA AGENŢILOR FIZICI ASUPRA VIRUSULUI

1. DESICAŢIE

Levaditi, Harvier şi Nicolau (59) (62) au arătat că virusul herpetic (creier de iepure) supus unei desicări în vid sulfuric, menţinut apoi la temperatura camerei îşi păstrează puterea sa patogenă o perioadă de timp de peste 40 de zile.

Ulterior, Blanc şi Caminopetros (13), Mariani (75), Friedli (33), Vegni (112), Bruni (17), Heuer (43), Le Fèvre le Arric (51) au mai studiat această problemă. Friedli arată că prin desicarea suspensiei obţinute din leziunile corneene herpetice virusul îşi pierde foarte rapid proprietăţile sale patogene; Heuer demonstrează că prin desicarea substanţei cerebrale de iepure cu ajutorul clorurii de calciu la întuneric şi vid, virusul îşi păstrează virulenţa aproape 8 luni, iar Le Fèvre de Arric (51) că virusul se conservă în măduva supusă desicaţiei pasteuriene, peste 100 de zile.

S-a arătat însă de către Hawkins (41) şi Holden (44) că virusul herpetic din ţesutul animal, uscat prin îngheţ şi conservat sub formă de pudră uscată, îşi menţine virulenţa o perioadă mult mai mare de timp (12 şi respectiv 18 luni).

Schneweiss (104) constată că lichidul de cultură celulară îşi pierde rapid din titrul său infectant dacă liofilizarea sau congelarea nu sînt făcute cu anumite precauţii.

2. CONGELARE

Ca şi virusul rabic, vaccinal etc., virusul herpetic îşi păstrează activitatea patogenă o perioadă de timp destul de lungă prin menţinere la 0°. S-a arătat de către Rivers (99) că virulenţa germenului dintr-o suspensie cerebrală nu creşte după 12 operaţii de îngheţ-dezgheţ, în timp ce după 24 de repetări virusul este inactivat. Virusul herpetic diluat 1/10 în mediul de cultură, supus îngheţului şi dezgheţului, îşi pierde din proprietăţile sale infectante (48).

Scanned with OKEN Scanner

Lépine, Artzet şi Céolin (53) demonstrează că o bună conservare a virusului herpetic din fragmentele de organe sau membrane corioalantoide poate fi asigurată prin congelare.

După Schneweiss (104) cea mai bună conservare a virusului herpetic din lichidele de cultură celulară se obţine prin congelare la —70° C.

3. CĂLDURĂ

La temperaturi ridicate virusul herpetic este foarte sensibil. Cercetările lui Löwenstein (71) şi Grüter (38) au arătat că o tulpină cheratogenă de virus herpetic este distrusă în 30 min la 56°. Levaditi şi Harvier (56), lucrînd cu un virus encefalitogen, constată că la temperatura de 55° virusul este distrus în 60 min. S-a arătat de către Luger şi Lauda (72) (73) că la 100° virusul este rapid omorît. Atît Vegni (112) cît şi Bruni (16) şi Mariani (76) confirmă aceste experienţe şi arată totodată (Vegni) că prin încălzire la 56° virusul îşi pierde proprietăţile sale cheratogene însă îşi menţine pe acelea encefalitogene. Grüter (38) constată că după 5 ore de menţinere la 36°C virusul este patogen pentru corneea de iepure, patogenitate care dispare după 10 ore de menţinere la această temperatură. După Löwenstein (71) virusul menţinut 48 de ore la 37° C îşi pierde însă virulenţa.

Speck, Jawetz şi Coleman (109) demonstrează însă că virusul herpetic *simplex* suspendat în albuş de ou suferă o degradare rapidă prin menţinere la 35° C ; acelaşi virus suspendat în gălbenuş de ou îşi conservă proprietăţile patogene.

Boak şi colab. (15) constată că la căldură virusul îşi păstrează mai bine proprietăţile neurotrope decît cele dermotrope. Încălzit la 107° C timp de peste $1^1/_2$ oră virusul îşi pierde complet proprietatea sa encefalitogenă (Kopeloff şi Holden, 50).

4. ULTRAPRESIUNE

S-a constatat de către Basset, Nicolau şi Macheboeuf (4) că virusul herpetic supus ultrapresiunii rezistă timp de 30 min la 1 000 şi chiar la 2 000 de atmosfere şi este inactivat la 3 000 de atmosfere. Animalele inoculate cu virusul astfel inactivat nu fac boala experimentală şi nici nu capătă o stare de imunitate.

5. IRADIAŢII CU RAZE ULTRAVIOLETE

McKinley, Fischer şi Holden (79) şi Levaditi şi Voet (68) (69) şi Levaditi (54) au demonstrat că razele ultraviolete au acţiune distructivă asupra virusului herpetic. Ulterior Edward şi colab. (27) stabilesc că

Scanned with OKEN Scanner

virusul herpetic este sensibil la razele ultraviolete cu lungime de undă de 2537 Å.

După Powell (97) razele ultraviolete absorbite de către nucleoproteina virală modifică configuraţia acidului nucleic, făcîndu-l inactiv.

6. IRADIAŢII CU RAZE INFRAROŞII

După Levaditi şi Voet (68) (69) razele infraroşii par să respecte puterea patogenă a virusului.

7. VIBRAŢII SONICE

Concentraţia virusului creşte de 3 ori prin expunerea suspensiilor herpetice la acţiunea vibraţiilor sonice timp de 1/2 min. După 15 min de expunere apare însă o oarecare inactivare a virusului (48).

ACŢIUNEA AGENŢILOR CHIMICI ŞI BIOLOGICI ASUPRA VIRUSULUI

1. OXIDARE ŞI REDUCERE

Zinsser şi Tang (124) au demonstrat că virusul herpetic în contact cu oxigenul îşi pierde rapid virulenţa, în timp ce menţinut în condiţii de anaerobioză îşi menţine activitatea patogenă. Zinsser şi Seastone (122) au constatat însă că prin adăugarea de cisteină, care este un reductor, virusul îşi menţine mult timp virulenţa.

Fenomenul a fost ulterior studiat şi de Perdrau (95), care arată că un mediu reductor poate restitui virulenţa pierdută a unei suspensii de virus inactivate prin oxidare.

2. ACŢIUNEA PH-ULUI

Virusul îşi poate conserva virulenţa timp de 6 ore la temperatura laboratorului, în suspensii cu pH 4,6 — 4,8 (85) (86).

3. ACŢIUNEA GLICERINEI

Virusul herpetic îşi conservă cel mai bine activitatea patogenă prin menţinere în glicerină. În mod obişnuit o tulpină de virus herpetic este conservată la +4° C sub formă de fragmente de ţesut cerebral provenite

Scanned with OKEN Scanner

de la animalul mort de nevraxită herpetică experimentală, introduse în glicerină neutră, pură sau diluată 50%. În aceste condiţii, activitatea patogenă a germenului este păstrată luni şi ani de-a rîndul. Seidenberg (106) susţine chiar că acest virus a putut fi conservat în glicerină aproape 5 ani.

În general, timpul de conservare în glicerină al patogenităţii unei tulpini de virus herpetic este în raport direct cu virulenţa sa, tulpinile *forte* sînt virulente chiar după aproape 18 luni de menţinere în glicerină, în timp ce tulpinile *slabe* se sterilizează mult mai rapid.

Menţinerea virusului sub formă de fragmente de creier în glicerină neutră asigură o bună conservare (51). Perdrau (93) arată că oxidarea glicerinei duce la o inactivare a virusului, iar Levaditi şi Harvier (56) constată că în anumite condiţii virusul herpetic menţinut în glicerină, sub formă de creier de iepure mort de encefalită, devine mult mai activ decît virusul proaspăt. Acest fapt i-a determinat pe autori să considere că în creierul proaspăt ar exista unele substanţe cu o acţiune neutralizantă asupra virusului, care sînt anihilate sau atenuate de glicerină. Mai tîrziu Perdrau (92) constată că inocularea iepurilor cu o suspensie de creier proaspăt de la un om mort de encefalită letargică nu a determinat nici un fenomen de encefalită. Inoculînd însă suspensia obţinută din acelaşi creier menţinut cîtva timp în glicerină, izbuteşte să obţină la iepure o encefalită herpetică. Berger (10), Da Fano şi Perdrau (21), Nicolau şi Kopciowska (87) izbutesc să reactiveze, prin menţinere la glicerină, virusul herpetic din creierul unui iepure mort de o infecţie herpetică aparent „autosterilizată".

Un fapt constatat de Levaditi, Lépine şi Schoen (64) este că amestecul mai multor eşantioane de creier glicerinat poate fi virulent, în timp ce inocularea fiecărui eşantion în parte rămîne fără rezultat.

4. ACŢIUNEA LAPTELUI DE VACĂ

Cercetările lui Levaditi, Harvier şi Nicolau (60) au arătat că, menţinut în laptele de vacă, virusul provenit din creierul unui iepure mort de encefalită herpetică experimentală îşi conservă virulenţa timp de 96 de zile, iar în apă sterilizată, cel puţin 15 zile.

Lépine (52 *a*) a arătat că virusul herpetic *simplex* poate fi conservat sub formă congelată sau la +4° cel puţin 6 luni fără să-şi modifice titrul, dacă la materialul infecţios se adaugă lapte.

Folosind ca excipient laptele degresat (pudră de lapte dizolvată în apă distilată şi autoclavată timp de 20 min la 105° C), Lépine şi colab. (53) obţin o bună conservare a virusului fie prin menţinerea sub această formă la temperaturi joase, fie prin liofilizarea sa (conservare timp de peste 1 an la +4° C).

5. ACŢIUNEA BILEI

S-a arătat de către Levaditi şi Harvier (58), şi de Blanc, Zsiminakis şi Caminopetros (14) că virusul herpetic este distrus *in vitro* de bilă.

6. ACŢIUNEA HEPARINEI

Plecînd de la faptul constatat de către Vaheri şi Penttinen (114) că fosfatul polifloroglucinol (polimer anionic) inhibă multiplicarea virusului herpetic, Vaheri şi Cantell (113) studiază acţiunea heparinei asupra virusului herpetic şi demonstrează că o concentraţie mai mare de 0,1 μg are într-adevăr o acţiune inhibantă asupra multiplicării virusului.

După aceşti autori heparina nu are acţiune asupra multiplicării intracelulare a virusului ci împiedică adsorbţia lui pe celulă.

Horváth şi Hadházy (45) constată că heparina are însă efect inhibitor asupra multiplicării virusului în celule HeLa, fibroblaste şi celule tiroidiene umane, el depinzînd de concentraţia substanţei ; la o diluţie de 10 μg/ml de heparină, titrul virusului scade cu 1,5 şi 3,5 log.

Aceleaşi rezultate au fost obţinute şi de Nahmias şi Kibrick (84). Autorii au demonstrat că heparina în concentraţie de 10—20 μg/ml inhibă multiplicarea a 30—300 DIC_{50} virus herpetic.

Schultz şi Neva (105) au arătat însă că această substanţă în concentraţie de 10—20 μg/ml nu mai prezintă o acţiune de inhibare asupra multiplicării virusului.

Nahmias şi Kibrick consideră ca şi Vaheri şi Cantell că acţiunea heparinei s-ar datora moleculei sale polianionice care s-ar opune adsorbţiei ionice a virusului la membrana celulară.

După Verdi şi Sera (116) acţiunea inhibitorie a heparinei asupra virusului herpetic s-ar datora fenomenelor electrostatice.

7. ACŢIUNEA ANUMITOR SOLVENŢI

Studiul acţiunii diverşilor solvenţi asupra virusului herpetic a dus la rezultate contradictorii ; astfel, în timp ce Hawkins (41) obţine inactivarea totală a virusului sub acţiunea alcoolului, acetonei, cloroformului şi toluenului, Holden (44) constată că alcoolul şi eterul atenuează virusul fără să-l distrugă complet.

8. ACŢIUNEA ANTISEPTICELOR

Levaditi şi Harvier (56), cercetînd virusul herpeto-encefalitic, constată că fenolul în concentraţie de 1% nu modifică activitatea patogenă a virusului după o perioadă de contact de 15 min, el fiind inactivat de-abia

după 3 zile. Concentraţiile mai mari de fenol (5%) distrug virusul după 18 ore de contact la +4° C.

Aceiaşi autori obţin o distrugere rapidă a virusului cu o soluţie de permanganat de potasiu 1‰ (după o oră de menţinere la temperatura camerei).

Formolul în proporţie convenabilă transformă virusul din patogen în imunogen.

Levaditi, Harvier şi Nicolau (62) au demonstrat că timolul, oleul mentolat, amestecul mentol-salol-acid boric au acţiune antiseptică foarte puternică.

9. ACŢIUNEA SUBSTANŢELOR COLORANTE

S-a demonstrat de către Levaditi, Harvier şi Nicolau (62) că anumite substanţe colorate (albastru de metilen, clorhidrat de parafuxină, roşu tripan, albastru tripan) în concentraţie de 1% inactivează virusul în 3 ore la 37°, în aşa fel încît el nu mai determină la iepure nici boala experimentală şi nici imunitate locală sau generală.

Efectul albastrului de metilen asupra germenului se datoreşte după Perdrau şi Todd (96) şi Soboldaeva şi Subladze (107) acţiunii fotodinamice a colorantului.

Roşu neutru nu are nici o acţiune asupra virusului herpetic (14).

S-a arătat de către Holden (44) că virusul herpetic sub formă de suspensie de creier de iepure, menţinut timp de 18 ore la +4°C în contact cu violet de genţiană în concentraţie de 1%, conţine o cantitate de virus suficientă pentru a determina la iepurele inoculat intracerebral fenomene de encefalită herpetică. Acelaşi virus, sub forma unei suspensii de membrană corioalantoidă, supus acţiunii violetului de genţiană în concentraţie de 1/5000 timp de 30 min, pierde aproximativ 95—99% din patogenitatea sa pentru oul de găină embrionat inoculat pe membrana corioalantoidă; la concentraţia de 1/50 000 colorantul nu diminuă însă acţiunea patogenă a virusului.

10. ACŢIUNEA NISIPULUI ARGINTAT

Nisipul argintat, pus în contact cu virusul herpetic *simplex*, are un efect inactivant datorită acţiunii sale oligodinamice (107).

11. ACŢIUNEA SULFAMIDELOR ŞI ANTIBIOTICELOR

Multiplicarea virusului herpetic nu este influenţată de sulfamide şi antibiotice. Aplicate atît în scop profilactiv cît şi curativ, ambele grupe de substanţe s-au dovedit ineficace (80) (32) (20) (2) (39) (18) (108) (122).

Scanned with OKEN Scanner

Mitomicina C (antibiotic derivat din *Streptomices caespitosus*), care inhibă selectiv sinteza ADN fără să afecteze pe aceea a ARN-ului sau a proteinei virale, inhibă sinteza ADN-ului virusului herpetic inoculat în culturi tisulare (82).

12. ACŢIUNEA ANTIMETABOLIŢILOR

S-a demonstrat că 5-iodo-2-dezoxiuridina, 5-bromo-dezoxiuridina, cytarabina şi tiosemicarbazonele au acţiune asupra virusului herpetic, multiplicarea sa fiind împiedicată printr-o acţiune a drogurilor respective asupra ADN (vezi tratamentul herpesului *simplex*).

13. ACŢIUNEA DIVERSELOR ENZIME

Virusul herpetic simplex este inactivat de către fosfatazele acidă şi alcalină, în timp ce tripsina, pepsina, ribonucleaza, ptialina şi lipaza nu exercită nici o acţiune asupra patogenităţii acestui germene inframicrobian (1).

14. ACŢIUNEA GUANIDINEI

Este cunoscut faptul că guanidina are acţiune inhibantă asupra virusurilor.

Schauer şi Likar (102) constată că guanidina în concentraţie de 10^{-5}M, instituită la 8, 24 şi 48 ore dela infecţie are o acţiune inhibantă asupra multiplicării virusului. Autorii demonstrează că aplicarea substanţei cu 3 — 48 de ore înainte de infecţie nu are însă nici un efect dacă ea este eliminată din cultură în momentul inoculării virusului. Guanidina s-a dovedit a nu avea acţiune nici asupra adsorbţiei şi nici asupra pătrunderii virusului în celulă. Ea acţionează chiar din primele stadii ale infecţiei şi-şi continuă acţiunea în cursul multiplicării şi maturării corpusculului viral.

15. ACŢIUNEA INTERFERONULUI

S-a observat de către Kohlhage şi Falke (49) că ARN-ul extras din celulele renale de iepure inhibă multiplicarea virusului herpetic *simplex* în culturile de celule HeLa, ca şi cum acest ARN ar fi un inductor de interferon în celulele HeLa.

Interferonul preparat pe fibroblaste de embrion de găină infectate cu virus herpetic inhibă multiplicarea virusului în culturi tisulare (34).

Scanned with OKEN Scanner

16. ACȚIUNEA AUTOLIZEI CADAVERICE

Levaditi și Harvier (56), menținînd la temperatura laboratorului creierul de iepure mort de nevraxită herpetică, constată că autoliza cadaverică respectă virulența germenului inframicrobian herpetic timp de 48 de ore după moartea animalului. Începînd din ziua a 4-a de menținere a creierului de iepure la +10 — 20° C, Mariani (75) observă o atenuare parțială a virulenței germenului.

17. ACȚIUNEA MICROBILOR

Anumiți microbi (meningococul, bacilul lui Pfeiffer, stafilococul, bacilul Coli, streptococul, bacilul difteric) măresc puterea patogenă a virusului herpetic dacă sînt instilați în sacul conjunctival al unui iepure inoculat cu virus herpetic pe corneea scarificată sau dacă fragmentele virulente de creier sînt introduse în culturile cu acești germeni. Alți microbi (bacilul piocianic, Proteus) micșorează virulența germenilor herpetici. Un al treilea grup de microbi, din care face parte și pneumococul, se comportă ca elemente indiferente (3).

BIBLIOGRAFIE

1. Amos, H. — J. exp. Med., 1953, *98*, 365.
2. Baldridge, G. D., Blank, H. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1949, *72*, 56.
3. Balo, J. — Z. Hyg., 1929, *110*, 599.
4. Basset, J., Nicolau, S., Macheboeuf, M. A. — C. R. Acad. Sci., 1935, *200*, 1882.
5. Bechold, H., Schlessinger, M. — Z. Hyg., 1933, 115, 342.
6. Bedson, S. P. — Brit. J. exp. Med., 1927, *8*, 470.
7. Bedson, S. P. — Brit. J. exp. Path., 1929, *10*, 364.
8. Bedson, S. P., Bland, J. O. W. — Brit. J. exp. Path., 1929, *10*, 67.
9. Ben-Porat, T., Kaplan, A. S. — Virology, 1952, *16*, 261.
10. Berger, W. — Wien. klin. Wschr., 1922, *35*, 801.
11. Berger, W. — Wien. klin. Wschr., 1922, 41, 801.
12. Blanc, G., Caminopetros, J. — C.R.Soc. Biol., 1921, *84*, 629.
13. Blanc, G., Caminopetros, J. — Tunis Médical, 1922, mai.
14. Blanc, G., Zsiminakis, J., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, *85*, 290.
15. Boak, R. A., Carpenter, C. M., Warrem, S. L. — J. exp. Med., 1940, *71*, 169.
16. Bruni, F. — Eziolog. dell'Herpes, Tip. Coop. Pavia, 1923.
17. Bruni, F. — citat de C. Levaditi în *L'herpès et zona*, Masson, Paris, 1926.
18. Buerk, M. S., Blank, H. — New Engl. J. Med., 1951, *244*, 670.
19. Coriell, L. L., Blank, H., Scott, T.F.Mc.N. — J. lab. clin. Med., 1949, 34, 402.
20. Cutting, W. C. et al. — J. Immunol., 1947, *57*, 379.
21. Da Fano, C., Perdrau, J. R. — J. Path. Bact., 1927, *30*, 67.
22. Doerr, R. — Zbl. Haut-GeschlKr., 1925, *15*, 315.
23. Doerr, R., Berger, W. — Schweiz. med. Wschr., 1922, *35*, 862.
24. Doerr, R., Schnabel, A. — Z. Hyg., 1921, *94*, 30.
25. Doerr, R., Schnabel, A. — Schweiz. med. Wschr., 1921, *51*, 469 și 562.
26. Doerr, R., Zdansky, E. — Schweiz. med. Wschr., 1923, *14*, 349; Z. Hyg., 1924, *102*, 1.

Scanned with OKEN Scanner

CULTIVAREA VIRUSULUI

A. CULTIVARE ÎN OUL DE GĂINĂ EMBRIONAT

Astăzi, datorită punerii la punct a culturilor celulare, oul de găină embrionat este puţin folosit la studiul virusului herpetic. Totuşi unele laboratoare de specialitate îl mai utilizează la izolarea, titrarea şi seroneutralizarea virusului herpetic.

1. CULTIVARE PE MEMBRANA CORIOALANTOIDĂ

Încă de mult timp, Goodpasture, Woodruff şi Buddingh (53), Saddington (161), Dawson (29), Burnet (16), Burnet şi Lush (20), Burnet, Lush şi Jackson (22), Anderson (4) (5), Smith, Lennette şi Reames (178) etc. au reuşit să cultive virusul herpetic pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat.

Cercetările întreprinse de Beveridge şi Burnet (12) au demonstrat că îndată ce virusul herpetic se adaptează la membrana corioalantoidă el determină moartea embrionilor în 3—5 zile de la inoculare, iar lichidele extraembrionare conţin o cantitate mare de virus (10^{-4} — 10^{-7}/ml).

S-a constatat de către Anderson (4) (5) şi Beveridge şi Burnet (12) că pasajele seriate pe membrana corioalantoidă măresc virulenţa virusului pentru embrionul de găină, însă scad patogenitatea pentru corneea scarificată de iepure.

La inocularea pe membrana corioalantoidă se utilizează ou de 10—11 zile. Virusul herpetic inoculat pe această cale se multiplică în 1—2 zile şi determină după 3—6 zile, uneori chiar de la primul pasaj, leziuni veziculare („pocks") comparabile cu cele produse de acest virus pe corneea scarificată de iepure. Leziunile încep să apară la aproximativ 20 de ore de la inocularea virusului; ele sînt de aspect albicios, de formă ovalară şi de dimensiuni cuprinse între 1 şi 2 mm, sau chiar mai mari, în funcţie, după Wildy (217), de tulpina de virus izolată sau folosită în experimentaţie (tulpini S.L. — *small lesions* = ce determină leziuni mici şi tulpini L.O.L. — *large opaque lesions* = producătoare de leziuni mari, opace).

Leziunile mai înaintate prezintă aspectul unor focare de culoare albicioasă cu necroză centrală şi reacţie mezodermală.

Evident că în încercările de izolare acest aspect macroscopic al leziunilor membranei corioalantoide nu poate fi suficient pentru a spune cu precizie că leziunea este herpetică, focarele lezionale fiind foarte asemănătoare cu cele din infecţia vaccinală, aşa încît se impune examenul histopatologic.

Studiile lui Anderson (5) au stabilit că membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat inoculată cu virus herpetic prezintă o proliferare

a celulelor ectodermice şi endodermice, cu discretă reacţie inflamatorie limfo-histiocitară, precum şi necroze şi descuamări ale celulelor ectodermice care cresc în intensitate cu cît numărul pasajelor este mai mare.

2. CULTIVAREA ÎN OU PE DIVERSE ALTE CĂI

Virusul herpetic cultivă foarte bine în oul de găină embrionat prin inoculări intraamniotice, intraalantoidiene, intraviteline sau direct în embrion. Introdus pe aceste căi virusul se multiplică şi determină moartea embrionilor în 2—4 zile, în funcţie de tulpina de virus utilizată.

Nagler (118) Rose şi Molloy (155) obţin după 3 zile de la infectarea oului pe cale intravitelină o generalizare a virusului cu prezenţa sa în titruri foarte ridicate în lichidele aminotic şi alantoidian (10^7 particule/ml de lichid amniotic).

S-a demonstrat de către Burnet (17) şi Andersen (5) că virusul herpetic cultivă bine în cavitatea amniotică; în acest caz incluziile tipice infecţiei herpetice sînt prezente în ectodermul şi mezodermul amniotic, în celulele epiteliului cutanat şi faringian şi în celulele musculare ale embrionului.

Plecînd de la faptul constatat de Hamburger şi Habel (62) că virusurile gripal şi urlian cultivă foarte bine în ouă embrionate în vîrstă de 2 zile, Scott şi Yoshino (176) inoculează virusul herpetic *simplex* în blastodermul ouălor embrionate de o zi şi obţin, la o parte din acestea, oprirea în dezvoltare a embrionilor şi o creştere a titrului virusului în albumen după 3—5 zile de la instituirea infecţiei.

Yoshino (221), continuînd aceste cercetări, demonstrează că blastodermul ouălor în vîrstă de o zi este tot atît de sensibil faţă de virusul herpetic ca şi ectodermul membranei corioalantoide a ouălor embrionate în vîrstă de 12—13 zile; pentru infectarea oului în vîrstă de o zi este suficientă, după autor, o singură unitate formatoare de colonii, însă numărul cel mai mare de embrioni nedezvoltaţi este prezent la diluţia de virus ce conţine cele mai multe unităţi formatoare de colonii.

Ţesutul blastodermic, care în mod normal are la 24 de ore un diametru de 1 cm, prezintă în urma instituirii infecţiei o oprire a proliferării celulare, mitozele normale fiind încetinite după invazia celulelor de către virus.

La 24 de ore de la inoculare titrul virusului intracelular este maxim, iar în următoarele 2—5 zile germenul este eliberat din celule.

Taniguchi (195) constată că virusul herpetic cultivă în celulele blastodermice ale oului menţinut în condiţii de anaerobioză (parafină lichidă la 37° C).

După Yoshino, tehnica inoculării în blastoderm poate fi folosită pentru menţinerea tulpinilor de virus herpetic în laborator, pentru titrarea virusului, pentru studiul curbelor de creştere a virusului în celula gazdă

şi pentru prepararea de antigene ce pot fi folosite cu bune rezultate în reacţia de fixare a complementului sau în testul de alergie cutanată (virusul prezent în gălbenuş fiind lipsit de componente tisulare).

B. CULTIVARE ÎN OUL DE RAŢĂ EMBRIONAT

S-a arătat de către Gispen şi Saathof (51) că oul de raţă embrionat, inoculat pe membrana corioalantoidă cu lichidul vezicular recoltat de la indivizi cu herpes tegumentar, este mult mai sensibil faţă de virusul herpetic decît oul de găină embrionat. Susceptibilitatea oului de raţă este identică cu aceea a şoarecelui nou-născut inoculat intracerebral.

Izolarea şi adaptarea virusului pe oul de raţă este mult mai uşor de realizat; totuşi autorii nu constată nici o diferenţă între titrul virusului cultivat prin treceri pe membrana corioalantoidă a oului de raţă şi cel cultivat pe membrana corioalantoidă a oului de găină. Diferenţa constă numai în aceea că incluziile tipice virusului herpetic sînt mult mai numeroase în nucleii celulelor membranei corioalantoide a oului de raţă, ele fiind prezente chiar la primele pasaje; de asemenea, antigenele preparate din suspensiile de membrană corioalantoidă a oului de raţă sînt de 10 ori mai active în reacţia de fixare a complementului decît cele din membrana corioalantoidă a ouălor de găină embrionate infectate cu acelaşi virus.

C. CULTIVARE ÎN TUMORI ANIMALE

Încă din 1922 Levaditi şi Nicolau (99) au demonstrat că virusul herpetic inoculat în epiteliomul de şoarece cultivă în această tumoare şi îşi păstrează intactă virulenţa.

Cercetările lui Levaditi şi Schoen (102) au arătat că acelaşi virus inoculat la iepure purtător de papilom Shope, fie intratumoral fie intravenos nu poate fi pus în evidenţă la nivelul tumorii.

Placido de Sousa şi Fereira (142) demonstrează, prin titrări, prin prezenţa incluziilor intranucleare şi prin aspectele electronooptice că virusul herpetic se multiplică în tumora mamară a şoarecelui. Autorii însă nu găsesc niciodată în aceeaşi celulă ambele particule virotice, aceea a agentului tumoral în citoplasmă şi aceea a virusului herpetic intranuclear.

D. CULTIVARE ÎN CULTURI CELULARE

1. CULTIVARE PE CELULE PRIMARE ŞI PE LINII CELULARE CONTINUE

Culturile celulare, indiferent de originea lor, sînt astăzi cele mai folosite pentru studiul virusului herpetic.

Levaditi, Harvier şi Le Fèvre de Arric (97) sînt cei dintîi autori care izbutesc să menţină virusul herpetic în 3 pasaje succesive pe ţesutul

testicular de iepure. Cîţiva ani mai tîrziu, Parker şi Nye (137) dovedesc că virusul herpetic *simplex* cultivat pe fragmentele testiculare de iepure în picătură suspendată îşi menţine proprietatea sa de a provoca keratita experimentală la iepure. Ulterior, Gildemeister, Haagen şi Scheele (50), efectuînd un număr mai mare de pasaje pe acelaşi suport celular menţinut în picătură suspendată, obţin modificări ale virusului ; el îşi pierde treptat neurotropismul. Această pierdere a unei proprietăţi importante s-ar datora cultivării virusului pe un substrat neobişnuit.

Fig. 31. — Cornee de iepure infectată cu virus herpetic şi cultivată 48 de ore *in vitro*. Se observă incluzii nucleare, tipice herpesului. Rivers, Haagen şi Muckenfuss, 1929.

Virusul herpetic, care are afinitate pentru ţesuturile ectodermice, cultivă foarte uşor *in vitro* pe elementele mezenchimatoase de tip fibroblastic din testiculul de iepure. Nicolau şi Kopciowska (122) arătaseră însă cu mult timp înaintea acestor experienţe că, *in vitro*, virusul herpetic se poate multiplica şi în celule de origine mezenchimatoasă.

Andrewes (6) şi Saddington (160) izbutesc să menţină virusul herpetic prin treceri seriate (20—25 pasaje) în culturile testiculare de iepure preparate după metoda Maitland. Cu acea ocazie Andrewes demonstrează că incluziile nucleare sînt prezente atît în celulele germinale cît şi în cele interstiţiale din ţesutul testicular.

Rivers, Haagen şi Muckenfuss (149) constată că virusul herpetic cultivă pe celulele corneene de iepure şi descriu ca leziuni balonizarea şi rotunjirea celulelor, prezenţa punţilor intercelulare şi apariţia de celule gigante cu incluzii intranucleare (fig. 31).

Haagen (61), Gastinel, Ştefănescu şi Reilly (49) utilizează culturile celulelor de embrion de găină cu rezultate de asemenea bune.

Acelaşi suport celular a fost folosit şi de Cheever (23) şi Cheever şi Willmert (24), iar rezultatele experimentale au fost identice cu cele ale lui Haagen şi Gastinel şi colab.

Magrassi (105) cultivă virusul herpetic în celulele nervoase de embrion de iepure. Folosind această metodă de cultivare, Haagen reuşeşte să realizeze 50—60 pasaje în serie şi să obţină unele modificări ale virusului.

O dată cu punerea la punct a culturilor celulare, virusul herpetic a fost studiat pe celule în monostrat de diverse provenienţe. Astfel, Stulberg şi Shapira (189) demonstrează că fibroblastele de pulmon şi cord de embrion de găină se pretează foarte bine la cultivarea virusului herpetic. La aceleaşi concluzii ajunge şi Bickerstaff (13).

Folosind diverse ţesuturi embrionare de găină, Barski, Maurin şi Lépine (10) constată că cel mai sensibil pentru cultivarea virusului este ţesutul nervos.

Tot cu rezultate bune au fost folosite celulele corneene de iepure (172) (201), celule renale de iepure (9), celulele renale de maimuţă şi celulele pulmonare de embrion uman (87) (82), celulele cutanate umane (214), celule amniotice umane (92) (193) (184) (203) (2), celule de corion uman (96), celulele testiculare de bou (76).

Pe celule corneene de iepure, Uchida (201) arată însă că leziunile apar şi progresează mult mai rapid în celulele epiteliale decît în celulele stromale, endoteliale şi fibroblaste, toate infectate cu cantităţi egale de virus. Între celulele stromale şi linia de fibroblaste nu apare nici o diferenţă semnificativă în ceea ce priveşte răspunsul lor faţă de inocularea virusului.

O asemănare în ceea ce priveşte susceptibilitatea faţă de virus şi aspectele morfologice a fost observată între celulele stromale şi endoteliale.

După autor, caracteristica leziunilor induse de virus în celulele epiteliale este prezenţa celulelor gigante sinciţiale, iar în celulele stromale, endoteliale şi fibroblaste, rotunjirea celulelor şi prezenţa de mici celule gigante.

Aceste diferenţe morfologice ar sugera după autor că răspunsul celular faţă de virus este în funcţie de tipul celulei gazdă.

Numeroşi autori au cercetat de asemenea susceptibilitatea celulelor HeLa (164) (57) (82), KB (68), Hep-2, Detroit-6, FL (amniotice umane), L (fibroblaste de şoarece) (163) (138), conjunctivale umane (celule Chang) (68), celule ZP-1/58 şi KrP-2/58 (193), celule de embrion de şoarece (ES), de pulmon de embrion uman (P.1.EU), de rinichi de embrion uman (R.1.EU) (3) etc. faţă de virusul herpetic *simplex*.

Din datele obţinute s-a stabilit că virusul herpetic cultivă foarte uşor atît pe celulele primare obţinute prin tripsinizarea fragmentelor de organe cît şi pe celulele întreţinute în linii continue.

Cercetările au arătat însă faptul că în culturi celulare în monostrat virusul are o perioadă de latenţă de aproximativ 8 ore, şi că aceasta nu

Scanned with OKEN Scanner

este influenţată de cantitatea inoculului ; după multiplicare virusul are un titru de ordinul $1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-4,5}$. Virusul, cultivat pe celule embrionare de găină, are însă titrul între $1 \times 10^{-4,5}$ şi $1 \times 10^{-5,5}$

După autori, propagarea infecţiei poate fi realizată fie prin intermediul mediului de cultură, fie prin contiguitate, de la o celulă la alta, titrul maxim al virusului fiind atins după 24 — 30 de ore cu mici variaţii în funcţie de tulpina de virus şi mediul utilizat. S-a demonstrat însă că temperatura influenţează de asemenea multiplicarea virusului.

Menţinînd culturile celulare infectate cu herpes la temperaturi cuprinse între 20,5 şi 27,7° C, Wheeler (208) nu obţine multiplicarea virusului, temperatura optimă multiplicării fiind la 35°C.

Ulterior, Wheeler şi Canby (212), studiind curbele de creştere a virusului herpetic pe celulele HeLa menţinute după infectarea lor la diverse temperaturi (40° ; 35° ; 30° ; 25°), observă acelaşi fenomen, şi anume că temperatura de 35° este cea mai favorabilă dezvoltării virusului. La această temperatură virusul nou apare în celulă într-un titru foarte ridicat (10^5 unităţi formatoare de plaje/ml), mult mai devreme (în 10—16 ore) decît la celelalte temperaturi, şi este eliberat în cantitate mare în mediul de cultură.

În tuburile menţinute la 40° virusul nou apare în celulă în aproximativ aceeaşi perioadă de timp observată la tuburile menţinute la 35° C, însă la un titru mai scăzut şi fără ca el să fie eliberat în mediul de cultură. La 30° C virusul apare în celule în cantitate foarte mică şi după o perioadă de latenţă de 2 ori mai lungă (22—26 de ore) decît la 35°, el neputînd fi evidenţiat în mediul de cultură. La 25° C virusul nou nu a putut fi detectat nici în celule şi nici în mediul de cultură.

Wheeler şi Canby (213) constată că multiplicarea virusului poate să nu aibă loc în celulele HeLa menţinute la temperatura de 25° timp de 9 zile. Virusul se multiplică activ dacă celulele HeLa, care au fost inoculate şi menţinute la temperatura de 25°C, sînt incubate la temperatura de 35° C.

Greenberg şi Steward (60), studiind efectul hidrocortizonului asupra celulelor HeLa infectate cu virus herpetic, constată că inocularea celulelor cu virus nu provoacă nici o modificare a cantităţii de hidrocortizon fixate de celule la 37° C sau +4° C. Hidrocortizonul determină însă o uşoară diminuare a utilizării de către celule a glucozei din mediu şi o scădere proporţională a glucozei stocate în celule.

Wheeler, Harvie şi Canby (215) demonstrează că hidrocortizonul, adăugat în cantitate de 1,5 sau 10 mg/ml pe celule HeLa infectate, nu modifică cu nimic cantitatea de virus herpetic produsă, ci determină o întîrziere şi o diminuare a degenerescenţei nespecifice a acestor celule.

Sistemele celulare cele mai folosite în special pentru izolarea şi studiul propagării virusului sînt celulele renale de iepure (9), (203) celulele renale de maimuţă (87) şi celulele HeLa şi KB. Dintre acestea însă cele mai sensibile faţă de virusul herpetic *simplex* s-au dovedit a fi celulele renale de iepure.

Scanned with OKEN Scanner

Sosa-Martinez, Guttierez-Villegas şi Sosa (181), studiind sensibilitatea culturilor celulare de rinichi de iepure faţă de virusul herpetic *simplex*, demonstrează că virusul se dezvoltă în aceste celule, curba sa de creştere fiind identică cu cea observată pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat şi în culturile celulare de cornee de iepure.

Datele obţinute de Barski şi colab. (9) au demonstrat că celulele renale de iepure sînt mult mai sensibile faţă de virusul herpetic decît şoarecele infectat cerebral sau oul de găină embrionat inoculat pe membrana corioalantoidă.

După aceşti autori, un mediu de creştere format din soluţie Parker (57%), lichid amniotic bovin (30%), ser de iepure (10%) şi extract embrionar de viţel (3%) are avantajul că asigură o creştere rapidă a celulelor şi o stabilitate morfologică a lor.

Schimbarea acestui mediu în momentul inocülării virusului cu un mediu de menţinere în care serul de iepure este înlocuit cu ser de cal asigură o bună cultivare a sa.

Leziuni produse de virus. Virusul herpetic se deosebeşte de multe alte virusuri prin efectul pe care-l produce în culturile celulare. Examenul culturilor celulare în stare proaspătă evidenţiază la 18—24 de ore de la inocularea virusului apariţia de mici grupuri de celule de aspect rotunjit, foarte refringente, dispuse în focare izolate, care se unesc treptat formînd un aspect de plajă, sau în focare mai întinse care au o dezvoltare mult mai rapidă (în funcţie de cantitatea mai mică sau mai mare a inoculului).

Tipurile de leziuni celulare sînt în funcţie atît de tulpina de virus şi suportul celular utilizate, cît şi de condiţiile de menţinere a culturii.

Grosso modo vorbind, virusul herpetic determină două tipuri de leziuni:

— prezenţa grupelor de celule de aspect rotunjit (fig. 32) sau fuziform, cu prelungiri citoplasmice (fig. 33) între ele, dînd aspectul unui ciorchine;

— prezenţa de sinciţii (fig. 34) formate din celule rotunde de dimensie moderată, cu mai mulţi nuclei în interior (3—10) sau de dimensii foarte mari cu numeroşi nuclei (10—100), uneori chiar de aspectul unei pînze sinciţiale în care se observă extrem de numeroşi nuclei dînd impresia că sînt lipiţi între ei.

Hoggan şi colab. (72) demonstrează că pentru a infecta o celulă este suficientă o singură particulă de virus şi că o celulă infectată va iniţia formarea unui sinciţiu.

Pe celulele renale de iepure, leziunile celulare încep să apară la 24—48 de ore şi se caracterizează prin rotunjirea şi balonizarea celulelor cu prezenţa de celule gigante ce conţin pînă la 30 de nuclei.

Microcinematografic s-a demonstrat însă de către Barski şi Robineaux (11) că celulele gigante apar chiar la 2—3 ore de la inocularea virusului.

În culturi celulare de testicul de bou, Huygelen (76) descrie apariţia, la 2 zile de la inocularea virusului herpetic *simplex*, a unui efect citopatic

caracterizat prin prezența de celule rotunde sau de formă neregulată, prin formarea celulelor sinciţiale şi prin degenerarea şi picnoza nucleilor; o săptămînă după inoculare celulele apar complet distruse.

Scherer şi Syverton (164) au arătat de asemenea că virusul herpetic se multiplică în celulele HeLa şi determină apariţia de celule gigante cu prezența de incluzii intranucleare.

Folosind acelaşi suport celular, Gray, Tokumaru şi Scott (57) descriu trei aspecte ale efectului citopatic determinat de virusul herpetic : proliferativ, neproliferativ şi de celule gigante.

Primul tip constă din îngrămădirea celulelor în focare bine definite, cu prezența de incluzii nucleare în diverse stadii de dezvoltare. Cu timpul, focarul se extinde spre periferie, celulele din centrul său se desprind de pe sticlă şi lasă un loc gol, iar cele din jur se îngrămădesc şi se rotunjesc.

Cel de-al doilea efect citopatogen este caracterizat la începutul infecţiei prin rotunjirea celulelor grupate în jurul spaţiilor goale ; într-un stadiu mai avansat al infecţiei celulele lezate se desprind de pe peretele sticlei, iar cele rămase se îngrămădesc sub formă de ciorchini, legaţi între ei prin punţi citoplasmice. Printre aceste grămezi de celule se observă celule multinucleate gigante cu cel puţin 10 nuclei.

Tipul citopatogen de celulă gigantă este predominant format din celule multinucleate ce iau naştere, după unii autori, prin fuzionarea mai multor celule (membranele celulelor dispar, iar nucleii se aglomerează într-un singur înveliş citoplasmic,.

Nicolau însă, care a studiat minuţios formarea acestor celule gigante, demonstrează că la baza procesului nu stă o reunire de celule formate şi o constituire de sinciţiu prin ştergerea conturului citoplasmic al celulelor, ci o multiplicare de nuclei în aceeaşi celulă. Această înmulţire rapidă şi directă de nuclei, realizată în aceeaşi celulă sub influenţa virusului, nu este urmată de o cloazonare citoplasmică şi individualizare de celule mononucleate, ci de apariţia de celule gigante. Procese similare celui surprins în domeniul apariţiei celulelor gigante din herpes au fost studiate de Nicolau în domeniul multor altor virusuri (vaccină, rujeolă, variolă, zona zoster etc.).

Deşi mulţi autori admit aceste trei tipuri de efecte citopatice, unii insistă însă asupra faptului că de multe ori leziunea este mixtă.

Hoggan şi Roizman (70) descriu aspecte lezionale de micro- şi macroplaje ce corespund tipurilor citopatogene proliferativ şi celule gigante, descrise de Gray şi colab.

Hinze şi Walker (68) obţin pe celulele conjunctivale umane (Chang) şi KB infectate cu virusul herpetic *simplex* (tulpina HF) aspecte atipice de creştere celulară caracterizate prin existenţa unor mase formate din 15 — — 20 straturi de celule suprapuse în limite nete. Această creştere tridimensională a fost realizată de autori după o infecţie prelungită a celulelor cu virus herpetic (celulele inoculate cu 1 000 DIC_{50} de virus se menţin timp de 3 zile la 37°C, după care sînt tripsinizate iar subculturile păstrate

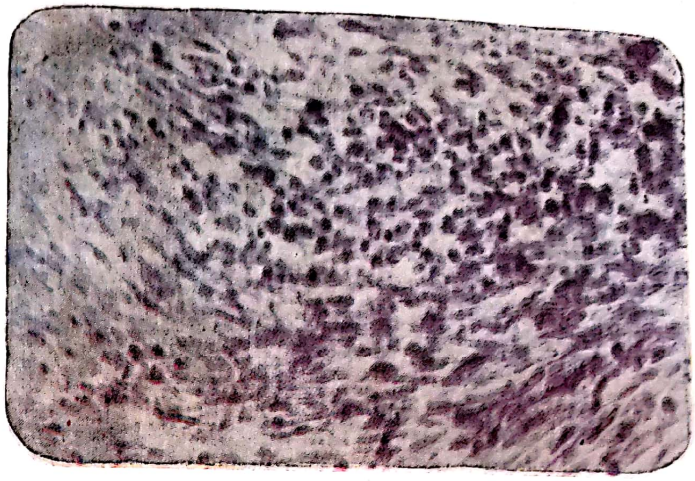


Fig. 32. — Celule embrionare umane. Focar de efect citopatic produs de virusul herpetic *simplex* (tulpina 6433). Colecţia Institutului de inframicrobiologie al Acad. R. S. România.

Fig. 33.— Celule amniotice umane. Efect citopatic produs de virusul herpetic *simplex*, şi punţi intercelulare. Colecţia Institutului de inframicrobiologie al Acad. R. S. România.

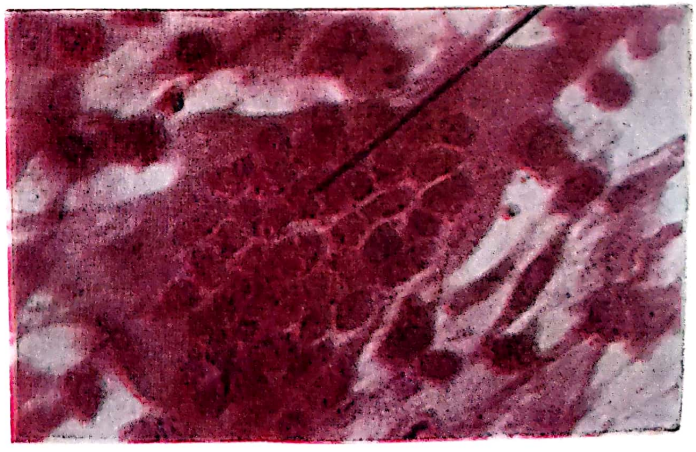


Fig. 34. — Celule embrionare umane. Celulă multinucleată (gigantă) produsă de virusul herpetic *simplex* (tulpina Bruxelles). Colecţia Institutului de inframicrobiologie al Acad. R. S. România.

Scanned with OKEN Scanner

timp de 10 săptămîni la 30° într-un mediu cu 20% ser uman ce conţine anticorpi herpetici).

Leziunile de proliferare celulară de aspect tridimensional s-au dovedit a fi stabile în prezenţa acestui ser în tot cursul celor 25 de clone efectuate. Înlocuirea lui cu un ser de cal sau cu ser imun de iepure duce la dispariţia acestui aspect lezional.

Deşi în aceste condiţii experimentale apar modificări celulare, prezenţa virusului sau a constituenţilor săi antigenici nu poate fi totuşi pusă în evidenţă prin tehnica anticorpilor fluorescenţi sau prin reacţia de fixare a complementului. Faţă de aceste rezultate, Hinze şi Walker consideră că fenomenul ar putea fi determinat fie de o transformare fie de o selecţie a unei mutante sub influenţa virusului herpetic.

Pe liniile celulare ZP-1/58 şi KrP-2/58, izolate din ţesutul pulmonar de iepure şi şobolan, Szántó (193) obţine leziuni asemănătoare celulelor gigante prin inocularea lor cu un virus herpetic care, în mod obişnuit, determină pe culturi tisulare de embrion de găină modificări citopatogene de aspect neproliferativ.

2. CULTIVARE ÎN CULTURI CELULARE SUB AGAR (PLAJE DE VIRUS)

Metoda plajelor, iniţiată de Dulbecco şi Vogt (33), este foarte utilizată în studiul virusurilor.

Black şi Melnick (14) au demonstrat că virusul herpetic B determină apariţia de plaje pe celulele renale de maimuţă. Ulterior, Kaplan (78), folosind aceeaşi metodă de lucru, constată că virusul herpetic *simplex* provoacă pe celulele renale de iepure acelaşi fenomen descris de Black şi Melnick.

Metoda plajelor, datorită consumului mic de materiale şi specificităţii ei, a fost apoi utilizată în special în titrările de virus herpetic *simplex*, folosindu-se diverse substraturi celulare (38) (208) (136) (204) (144) (68) (43) (202) (158) (127) (199).

Din datele obţinute de diverşi autori s-a ajuns la concluzia că celulele embrionare de găină sînt cele mai propice.

Waterson (204) obţine plaje după 3 zile de la inocularea virusului (fig. 35); după autor, numărul plajelor este direct proporţional cu concentraţia virusului inoculat, metoda fiind tot atît de sensibilă pentru studiul virusului herpetic ca şi celulele renale de iepure; este însă mult mai sensibilă decît celulele HeLa şi membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat.

Taniguchi şi Yoshino (196) studiază modul de a obţine celulele embrionare de găină, compoziţia mediului de creştere, condiţiile de adsorbţie a virusului şi de menţinere a celulelor după infecţie. Pentru obţinerea celulelor folosesc embrioni de găină în vîrstă de 9 zile. Fragmentele menţinute timp de 10 min în soluţie de tripsină 0,2% (pretripsinizare) sînt apoi tripsinizate (4 tripsinizări a cîte 7 min). De fiecare dată, lichidul obţinut prin tripsinizare este amestecat cu soluţie Hanks ţinută la rece şi filtrat prin

Scanned with OKEN Scanner

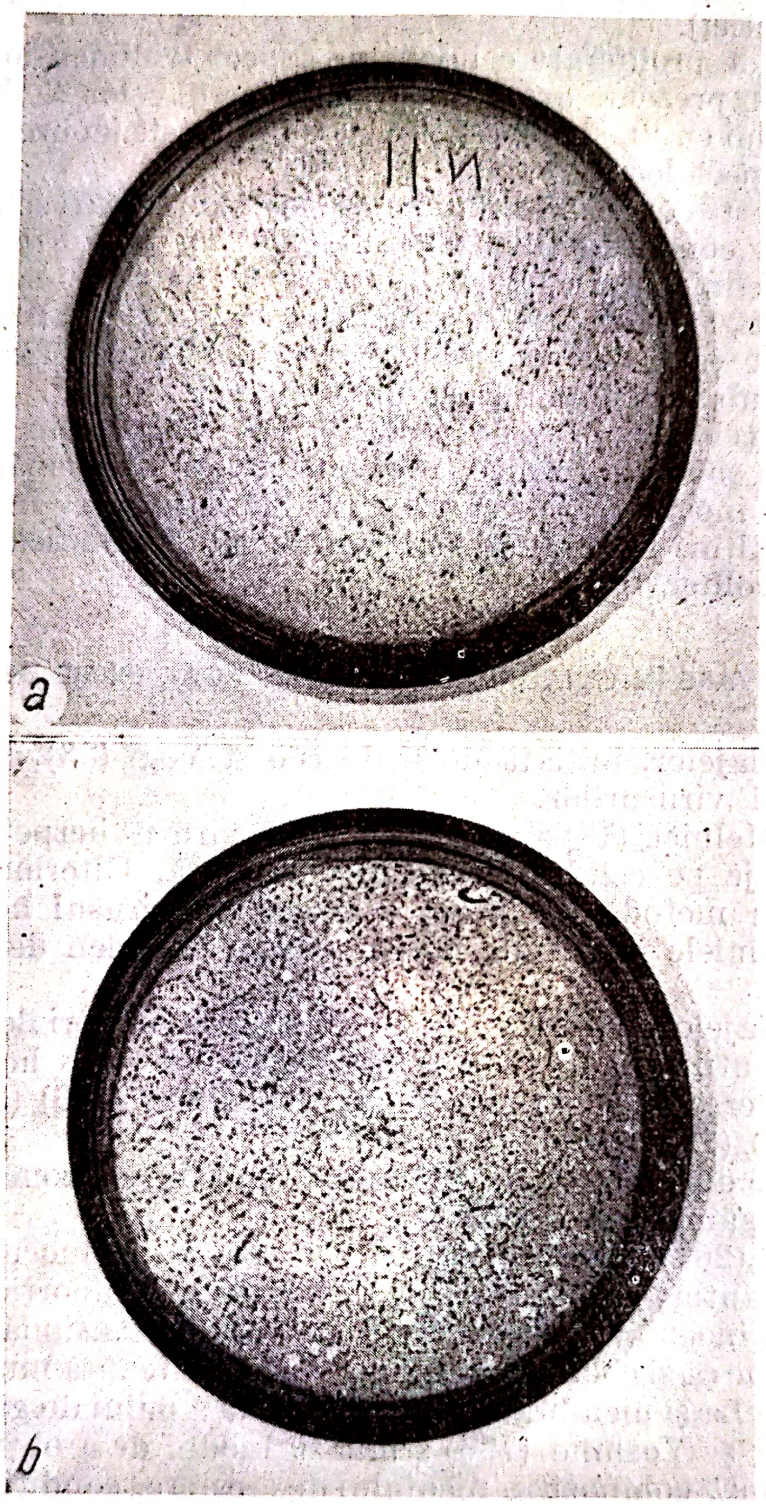


Fig. 35. — Plaje de virus. În *a*, aspectul la 4 zile al stratului de celule normale (neinfectate cu virus) colorat cu roşu neutru. În *b*, aspectul plajelor de virus apărute după inocularea celulelor cu 0,2 ml din diluţia $0{,}5 \times 10^4$ de virus. Waterson, 1959.

Scanned with OKEN Scanner

tifon. După obținerea întregii cantități de lichid se centrifughează 5 min la 800 t/min.

Mediul de creștere este format din soluție Earle cu 0,1% extract de drojdie de bere, 0,5% hidrolizat de lactalbumină, 20% ser de vițel inactivat și antibiotice.

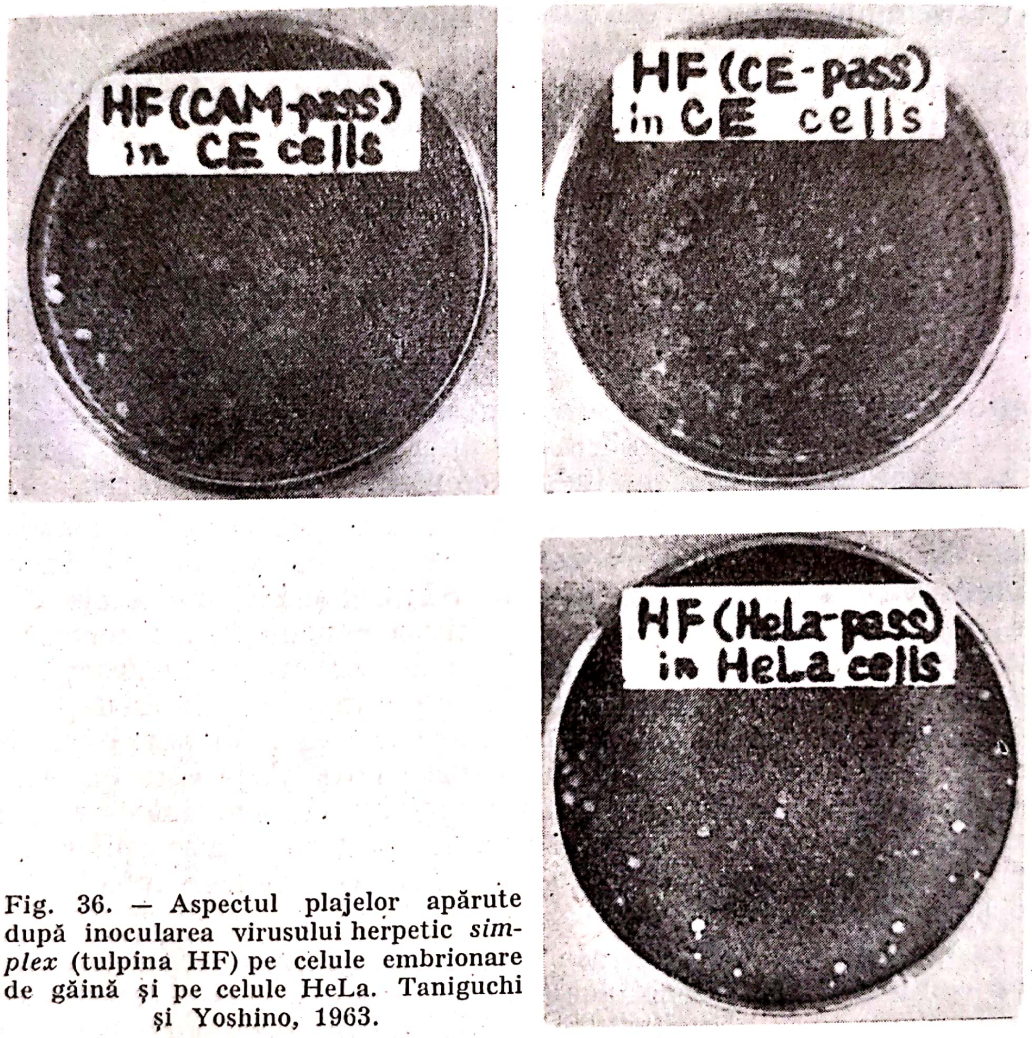


Fig. 36. — Aspectul plajelor apărute după inocularea virusului herpetic *simplex* (tulpina HF) pe celule embrionare de găină și pe celule HeLa. Taniguchi și Yoshino, 1963.

Cîte 5 ml din suspensia finală de celule cu o concentrație de 1 000 000 celule/ml se pun la o cutie Petri de 60 mm. După 2 zile de menținere a cutiei Petri la incubator, într-o atmosferă umedă cu 5% CO_2, se aspiră lichidul de cultură, iar pînza de celule este spălată o dată cu tampon fosfat salin (T.F.S.) care nu conține Mg sau Ca. După inocularea virusului (0,05 ml din diluțiile seriate de virus) cutia Petri se ține 1 oră în aceeași atmosferă de CO_2.

Se adaugă apoi 4 ml din amestecul în părți egale de soluție 2% agar topit și mediu de creștere dublu concentrat, conținînd 10% ser de vițel,

0,22% $NaHCO_3$, fără roşu fenol. După solidificare, cutia Petri este întoarsă cu faţa în jos şi pusă în incubator în atmosfera de CO_2. După 3 zile se pune un al doilea strat de amestec de soluţie 1% agar şi mediu de creştere (2 ml/ /cutie Petri) cu 1/10 000 roşu fenol. După 24 de ore de incubare se numără plajele şi se notează aspectul şi dimensia lor (fig. 36).

După autori folosirea unei doze mici de virus (0,05 ml/60 mm cutie Petri) este mult mai convenabilă în reproducerea plajelor decît dozele mai mari.

Metoda folosită de autori s-a dovedit a fi mult mai sensibilă în titrarea virusului decît cea a lui Russell, pe celule HeLa.

3. INFECŢIA HERPETICĂ PERSISTENTĂ

În ultimul timp s-a încercat obţinerea unei infecţii herpetice persistente *in vitro*.

Pelmont şi Morgan (138), menţinînd celulele infectate cu virus herpetic într-un mediu sărac din punctul de vedere al compoziţiei sale, demonstrează posibilitatea obţinerii unei infecţii herpetice persistente, virusul putînd deveni evident îndată ce mediul este îmbogăţit.

Wheeler şi Canby (211) obţin în prezenţa anticorpilor neutralizanţi specifici în culturi celulare o infecţie herpetică persistentă. Inoculează mai multe virusuri herpetice (tulpinile ST, CR şi HF) pe celule HeLa, pe care apoi le menţin într-un mediu nutritiv ce conţine fie ser normal de om, fie ser imun specific şi constată că tuburile care nu au anticorpi specifici în mediu prezintă la 5—10 zile de la infectarea lor fenomene citopatice specifice infecţiei herpetice; în tuburile care au însă anticorpi specifici în mediu, infecţia este limitată la formarea de plaje care cu timpul se măresc treptat, devenind confluente; ulterior ele sînt înlocuite prin noi creşteri de celule, aparent neinfectate. În prezenţa anticorpilor specifici, autorii izbutesc să menţină timp de 8 luni o astfel de infecţie cronică, în 16 subculturi celulare.

În cursul experienţelor sale asupra interacţiunii dintre virusul herpetic şi celulele HeLa, Fernandez (41) izolează celule care rezistă efectului citopatic al virusului, în prezenţa serului antiherpetic adăugat la mediu. Cu aceste celule, care deşi conţin virus în interiorul lor, autorul obţine în prezenţa serului anti colonii de celule de aspecte morfologice normale în 29 de subculturi. Înlăturînd serul anti din mediu, autorul constată apariţia efectului citopatic, ceea ce demonstrează că virusul poate persista o perioadă de timp destul de lungă în celule cultivate în prezenţa serului anti. Coleman şi Jawetz (27) obţin însă în culturi celulare o infecţie herpetică persistentă în absenţa anticorpilor specifici. Autorii inoculează virusul herpetic *simplex* (tulpina Z) pe celule stabile „Maben" (adenocarcinom pulmonar uman) cultivate într-un mediu compus din 10% ser de viţel, 45% soluţie Hanks şi 45% amestec 199 şi constată timp de 6—18 luni

Scanned with OKEN Scanner

că virusul este eliberat în cantităţi mari în mediu, însă fără apariţia unui efect citopatic tipic infecţiei herpetice. Aceste rezultate au fost obţinute numai în tuburile ce conţineau diluţiile de virus de aproximativ o unitate formatoare de colonii/10^4 celule (titrarea fiind făcută pe membrana corio-alantoidă a ouălor de găină embrionate în vîrstă de 12 zile) şi menţinute la temperatura de 31°C. Schimbînd temperatura de menţinere a culturilor de celule de la 31°C la 34°C autorii obţin o cantitate mult mai mare de virus eliberat în mediu şi o degenerare rapidă a celulelor, fapt ce demonstrează că latenţa virusului este dependentă de temperatura de menţinere a culturii celulare.

Autorii observă însă că adăugarea serului imun în mediul culturilor celulare cu infecţie persistentă determină, pentru moment, dispariţia virusului din mediu, pentru ca treptat, în curs de 3 săptămîni, el să reapară. Cercetările lui Coleman şi Jawetz au demonstrat că suspensiile de celule individuale infectate persistent, puse pe celule Maben neinfectate, în prezenţa serului antiherpetic, determină apariţia plajelor de virus ; acest fapt dovedeşte că virusul din celulele infectate persistent nu este neutralizat de anticorpii specifici extracelulari, el putînd invada celule învecinate prin punţile intercelulare descrise de Black şi Melnick (14).

Din rezultatele obţinute, autorii au conchis că pentru obţinerea unei infecţii herpetice persistente sînt absolut necesare : temperatură joasă de menţinere a culturii de celule, inocularea unei cantităţi mici de virus (o unitate formatoare de colonii pentru 10^4 celule) şi un mediu cu o compoziţie bine definită.

Dacă acest model experimental de infecţie persistentă în absenţa serului anti a putut fi realizat în condiţiile de mai sus, el nu a putut fi însă realizat pe celulele HeLa sau L, folosind aceeaşi tulpină de virus, sau pe celule Maben sau L folosind tulpina HF de virus herpetic.

Wheeler (209) urmăreşte microscopic şi prin titrări de virus efectul serului antiherpetic asupra evoluţiei infecţiei cu virus herpetic *simplex* în culturi de celule HeLa. Inoculează virusul şi adaugă ser antiherpetic în mediul de creştere, după perioada de adsorbţie. În unele din experienţele sale foloseşte doze variate de virus şi cantităţi constante de ser anti, iar în altele doze constante de virus şi cantităţi variate de ser.

Autorul observă că în absenţa anticorpilor celulele apar complet distruse, în funcţie de doza de virus inoculată, în timp ce culturile în mediul cărora fusese adăugat serul anti, distrucţia celulară nu apare, oricare ar fi doza de virus inoculată. Deşi în primele zile celulele apar infectate, un mic număr din cele neinfectate supravieţuiesc şi culturile se pot regenera. Aceste culturi regenerate sînt însă infectate persistent (*carrier cultures*). Ele pot fi menţinute infinit prin subculturi, celulele şi virusul multiplicîndu-se, cu condiţia ca un număr destul de mare de celule să fie transferat şi serul anti să fie menţinut în mediu. Îndepărtarea serului anti din mediu duce însă la apariţia efectului citopatic, ceea ce dovedeşte că prezenţa

Scanned with OKEN Scanner

anticorpilor nu previne trecerea virusului de la celulă la celulă şi nu elimină virusul din cultură.

Autorul conchide, bazat pe aceste experienţe, că infecţiile recidivante cu un virus herpetic pot apărea în ciuda prezenţei unei cantităţi mari de anticorpi circulanţi.

MULTIPLICAREA VIRUSULUI

Datorită tehnicilor moderne de lucru astăzi este bine stabilit faptul că în procesul de multiplicare al virusurilor există o fază de adsorbţie şi pătrundere, o fază de eclipsă şi o fază de eliberare a virusului din celulă.

În ceea ce priveşte multiplicarea virusului herpetic, ea a fost studiată de numeroşi autori (162) (173) (216) (111) (222) pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, folosind diverse tehnici de inoculare, durata fiecărei faze depinzînd de condiţiile experimentale.

Aceeaşi problemă a fost abordată de autori folosind culturile de celule corneene de iepure (172), de fibroblaste umane, linia pură de fibroblaste de şoarece (163), de celule embrionare de găină (189) (55), de celule renale de iepure (181) (9) (78), de celule renale de maimuţă (9), linii de celule HeLa (164), de celule KB (34) şi altele (91).

Şiegert şi Falke (176 a) redau în mod schematic fazele multiplicării virusului herpetic (fig. 37) bazaţi pe datele obţinute cu ajutorul microscopului electronooptic.

Rezultatele lui Scott şi colab. şi cele ale lui Wildy au fost identice în ceea ce priveşte procesul de multiplicare al virusului herpetic în celulele membranei corioalantoide, cu singura deosebire că primii autori observă o adsorbţie mult mai rapidă a virusului pe celule (99% faţă de 87% din cantitatea de virus inoculată); în 30 — 60 min de la inoculare, această cantitate de virus se fixează pe suprafaţa celulei şi devine în mod progresiv neinfluenţată de către serul antiherpetic.

Concomitent fazei de adsorbţie sau la cîteva minute după aceasta, virusul nu mai poate fi pus în evidenţă în suspensiile de membrane corioalantoide şi deci faza de eclipsă a apărut. La aproximativ 7 ore de la inoculare apare virusul nou format. După Wildy, numai o mică parte din virusul matur este eliberat din celule în acest interval de timp, iar restul, deci cea mai mare parte din el, se acumulează în celulă şi este pus în libertate o dată cu apariţia necrozei celulare; cu această ocazie celulele adiacente sînt invadate de virusul nou format care este eliberat.

Studiind acelaşi fenomen, Yoshino şi Taniguchi (222) constată că în 30 min aproximativ 80% din virusul herpetic inoculat este adsorbit de celulele membranei corioalantoide, restul (20%) rămînînd neadsorbit timp de cîteva ore.

Scanned with OKEN Scanner

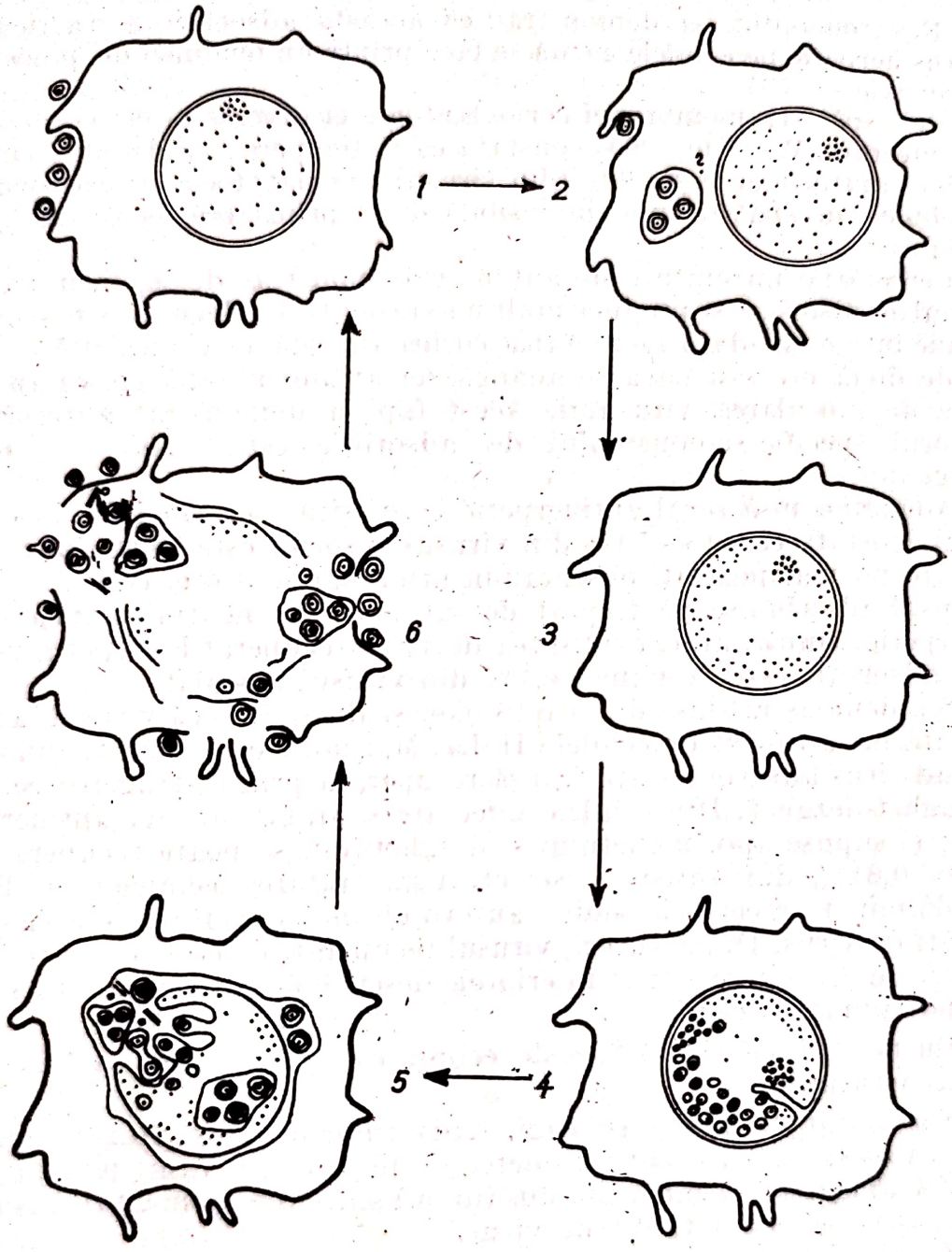


Fig. 37. — Fazele de multiplicare ale virusului herpetic *simplex*. *1*, faza de adsorbţie; se observă ataşarea virusului la membrana celulară; *2*, faza de pătrundere; se observă cum o particulă de virus este înglobată în celulă printr-o prelungire a membranei celulare; trei particule sînt deja în interiorul unei vacuole citoplasmice; *3*, faza de eclipsă; nucleul cu cromatina centrală rărită („veziculă virotică"); *4*, faza de multiplicare nucleară a virusului; se observă cromatina marginată, nucleolul dispărut şi apariţia corpusculilor nucleari primari şi a capsidelor; dedublarea lamelei interioare a membranei nucleare; *5*, maturizarea particulei virotice; virusul capătă învelişul său din lamela interioară a membranei nucleare; *6*, eliminarea virusului din nucleu în citoplasmă şi la periferia membranei celulare. Siegert şi Falke, 1966.

Scanned with OKEN Scanner

Electronooptic s-a demonstrat că această adsorbție a particulelor de virus herpetic pe celulele gazdă se face printr-un fenomen de pinocitoză — viropexie — (73).

Prin spălarea membranei corioalantoide la diverse intervale de timp de la infectare, Watkins (205) constată că la temperatura de 39°C celulele adsorb o cantitate de peste 90% din virusul inoculat, recuperarea virusului din lichidele de spălare fiind imposibilă după prima oră de la instituirea inoculului.

Cercetările întreprinse de autor au demonstrat de asemenea că fenomenul de adsorbție se produce mult mai rapid la 37° decît la +4° și nu este cu nimic influențat dacă membrana corioalantoidă este încălzită la +60° timp de două ore sau dacă se adaugă ser antimembrană corioalantoidă, înainte de inocularea virusului. Acest fapt a demonstrat autorului că receptorul specific fenomenului de adsorbție este stabil la + 60° și neantigenic.

Adăugînd însă serul antiherpetic la sfîrșitul perioadei de adsorbție, autorul constată că 40 — 70% din virusul adsorbit este neutralizat, fenomen care nu mai poate fi observat în următoarele 3 ore, ceea ce denotă că virusul adsorbit scapă treptat de sub acțiunea neutralizantă a serului antiherpetic. După autor, cantitatea de virus recuperat la sfîrșitul perioadei de adsorbție este de numai 0,1% din virusul inoculat.

S-a demonstrat însă de către Stoker și Ross (187) că virusul herpetic este puternic adsorbit de celulele HeLa. Mai mult de jumătate din cantitatea de virus adsorbit poate fi însă recuperată prin distrugerea celulelor prin îngheț-dezgheț. Din celulele infectate și tratate cu ser antiherpetic, spălate și supuse apoi înghețului și dezghețului, se poate recupera aproximativ 0,01% din virusul adsorbit. Prin tratarea celulelor cu EDTA (etilendiamin tetracetat de sodiu), autorii obțin recuperarea aceleiași mici cantități de virus. După autori, virusul recuperat, inaccesibil serului anti, ar fi virus extracelular situat în criptele descrise de Stoker, Smith și Ross (188) pe suprafața celulei.

Burnet (18) consideră faza de eclipsă ca o treaptă necesară în multiplicarea virusurilor.

S-a arătat că la bacteriofagi, scurt timp după realizarea infecției, virusul infectant nu poate fi detectat în bacterie cam jumătate din perioada de lag, adică jumătate din timpul scurs din momentul inoculului pînă la apariția noilor forme de virus.

În ceea ce privește virusurile animale, investigațiile făcute au demonstrat, cu excepția virusului WEE (157) care se comportă ca și bacteriofagii, că virusul detectat în perioada de lag reprezintă numai o parte din virusul luat de celule. Aceste rezultate au dus la două interpretări : *a*) că virusul detectat în perioada de lag ar fi părintele noului virus ce se va forma, iar acela care nu a fost detectat este distrus de celulă, el neavînd nici un rol în multiplicare ; *b*) că virusul detectat în perioada de lag este numai un fapt întîmplător, iar cel nedetectat va fi acela care va genera noul virus.

Scanned with OKEN Scanner

Date asupra fazei de eclipsă în infecţia cu virus herpetic au fost aduse încă din 1939 de către Schaffer şi Enders (162). Autorii, folosind oul embrionat de găină, pe care-l inoculează pe membrana corioalantoidă cu 120 de doze infectante de virus, constată că la 30 min de la infectare suspensiile de membrane corioalantoide conţin o cantitate de numai 10 doze de virus.

Scott şi colab. (173) utilizează o cantitate mult mai mare de virus (8×10^4 doze infectante) şi demonstrează că la 1, 4 şi 6 ore de la infectare suspensiile de membrane corioalantoide conţin de asemenea foarte mici cantităţi de virus.

Experienţele lui Modi şi Tobin (111) au arătat că în membrana corioalantoidă inoculată cu 2×10^6 şi 5×10^8 doze infectante de virus se poate detecta în 1 — 6 ore de la instituirea inoculului 1 — 10% din cantitatea de virus inoculată.

Scott, Coriell, Blank şi Gray (173), adăugînd ser anti la diverse intervale de timp de la infectarea membranei corioalantoide, observă că majoritatea virusului intră în celulă în 10 — 15 min de la inocularea lui. Efectuînd aceeaşi experienţă, Wildy (216) obţine rezultate care sugerează că pătrunderea virusului în celulă ar fi mult mai înceată decît observase Scott şi colaboratori. S-a arătat că dispariţia sau „eclipsa" majorităţii virusului adsorbit, pentru o perioadă de 7 — 12 ore, depinde de cantitatea inoculului, virusul infectant apărînd la periferia membranei celulare cam la 10 ore de la inocularea pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat.

Wildy (216), folosind o tehnică de lucru ingenioasă, studiază faza de eclipsă a virusului herpetic *simplex*. Infectînd oul de găină embrionat cu 100 de doze de virus (tulpina HF), autorul demonstrează că 4 — 6 ore mai tîrziu 33% din cantitatea virusului inoculat se găseşte ataşat membranei celulare şi în lichidele din jur. Russell şi colab. (159) demonstrează că virusul intră în faza de eclipsă în primele 4 ore de la inoculare, pentru ca în următoarele 5 ore infectivitatea sa să crească, iar numărul particulelor de virus, calculat după metoda lui Watson şi Wildy (207), să crească între a 3-a şi a 9-a zi (fig. 38).

Problema existenţei virusului intra- sau extracelular, în faza de eclipsă a preocupat pe mulţi cercetători. Iniţial s-a studiat virusul intracelular, după tratarea celulelor infectate cu ser antiherpetic. Andrewes (6) a fost primul autor care a arătat că serul anti, adăugat în culturi tisulare după inocularea virusului herpetic, nu influenţează cu nimic evoluţia infecţiei.

Gostling şi Bedson (55) demonstrează că celulele embrionare de găină menţinute peste noapte la + 4°C în contact cu virusul herpetic, adsorb aproximativ 1% din cantitatea iniţială de virus. Dacă însă suspensia de celule infectate cu virus este menţinută la 37°C, aproximativ 10% din virusul iniţial poate fi recuperat în primele 3 — 6 ore. Prin tratarea celulelor cu ser antiherpetic autorii constată că aproximativ 90% din această cantitate de virus dispare din fracţiunea celulară.

Folosind o soluţie de NaCl 6 g% pentru separarea nucleilor celulari, Gostling (54) cercetează, prin teste de infectivitate şi prin studii microscopice, dacă virusul nedetectabil în primele ore ale infecţiei a pătruns în nu-

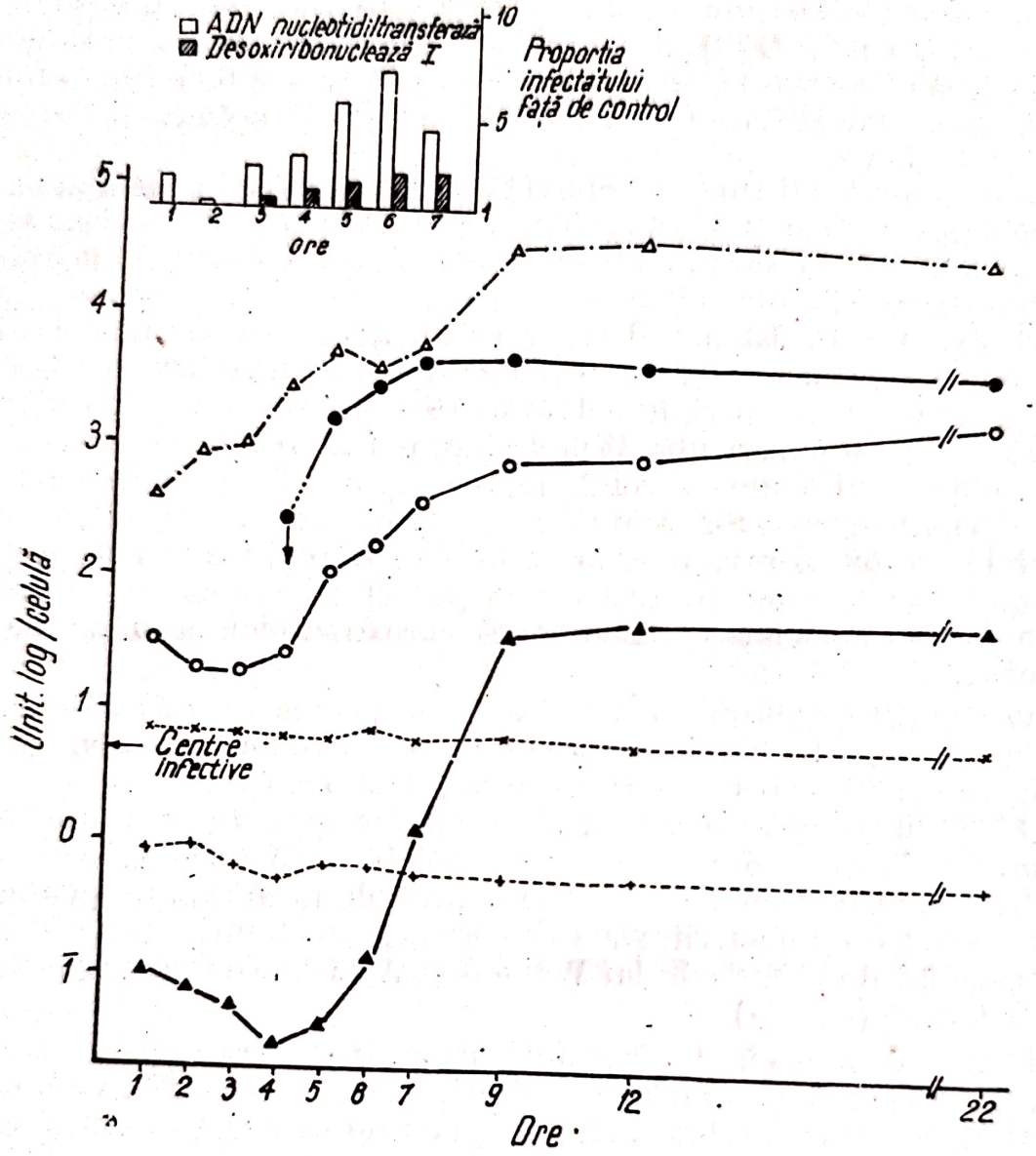


Fig. 38. — Celule BHK_{21} infectate cu virus herpetic *simplex*. Se observă curba creşterii virusului exprimată în unităţi pe celulă.

▲—▲ = infectivitate; ○—○ = particule; ●—● = echivalenţi la particule ADN dense; △—·—△ = echivalenţi la particule fixatoare de complement; × ··· × = ADN total μg/10^6 celule; + ··· + = proteină totală μg/10^4 celule. Russell şi colab., 1964.

cleul celulei. Cu această ocazie autorul constată că în primele 8 ore ale infecţiei cea mai mare parte a virusului este detectată în fracţiunea citoplasmică a celulei, fapt ce-l determină să considere că virusul preluat de celulă nu a intrat încă în nucleu în această perioadă de timp.

Yoshino şi Taniguchi (222) constată că membranele corioalantoide supuse acţiunii serului anti, la 1/2 oră de la infectarea lor, conţin în perioada de lag o cantitate de virus de aproximativ 0,0015 — 0,004%, faţă de 20% cît există în membranele martore netratate cu ser anti.

După autori virusul pus în evidenţă în perioada de lag ar fi extracelular. Cantitatea mică de virus care nu a putut fi complet îndepărtată prin tratare cu ser şi spălări repetate în tampon fosfat sugerează autorilor fie existenţa unei componente intracelulare, din care virusul nou va genera, fie prezenţa unui virus pe cale de a intra în faza de eclipsă.

Continuînd cercetările lor, Yoshino, Taniguchi şi Taniguchi (223) utilizează de astă dată ouă dezembrionate. O cantitate de virus de aproximativ 3×10^3 unităţi formatoare de vezicule/ou, reprezentînd 0,22% din inocul, a fost pusă în evidenţă, chiar după 50 de spălări, în celulele membranei corioalantoide recoltate, după o perioadă de adsorbţie de 2 ore. Prin tratarea membranelor cu ser anti autorii constată că virusul nu mai poate fi evidenţiat în lichidele de spălare, dar că el este prezent în omogenatele de membrane. Aceasta a făcut pe autori să considere că virusul rezidual este ataşat pe peretele celulei, probabil în criptele descrise de Stoker şi colaboratori, şi că deci el este inaccesibil acţiunii serului anti.

În membranele corioalantoide infectate şi supuse apoi acţiunii razelor ultraviolete virusul herpetic infectant dispare pentru o perioadă de 10 ore, după care reapare atît intra- cît şi extracelular.

Stoker şi Ross (187) au arătat că virusul nou format apare în celule la 12 ore de la infectare, pentru ca 4 ore mai tîrziu să fie eliberat în mediul de creştere al culturii.

Adăugînd ser antiherpetic la diverse intervale de timp de la inocularea celulelor HeLa, Watkins (206) demonstrează că virusul herpetic există sub forma a 4 fracţiuni :

1) fracţiunea A (în cantitate de 63%), care în următoarele două ore de la adsorbţie devine neinfectantă şi neinfluenţată de acţiunea serului anti ;

2) fracţiunea B (în cantitate de 16%), care în mai puţin de 6 ore de la adsorbţie devine infectantă şi sensibilă la acţiunea serului anti ;

3) fracţiunea C (în cantitate de 2%), care rămîne infectantă şi neinfluenţată de serul anti cel puţin 6 ore de la inoculare ;

4) fracţiunea D (în cantitate de 19%), care în timpul perioadei de adsorbţie devine inactivă şi neinfluenţată de serul anti.

Este clar că între fracţiunea A şi D există relaţii, dispariţia proprietăţii infectante şi insensibilitatea faţă de serul anti apar fie simultan, fie într-un timp foarte apropiat. Virusul nou s-ar forma, după autor, din aceste două fracţiuni.

În infecţia herpetică, prin tehnici histochimice, imunobiologice şi de microscopie electronică, s-a stabilit că începînd din a 9-a oră de la instituirea inoculului apare o creştere a ADN în nucleu şi apoi în citoplasma celulei, din a 12-a oră o creştere a infectivităţii celulelor, iar cîteva ore mai

Scanned with OKEN Scanner

tîrziu aceea a mediului culturii. Odată cu apariţia virusului în mediu, infecţia se propagă de la o celulă la alta fără ca ea să poată fi influenţată de serul specific adăugat culturii respective. Faptul că anticorpii specifici nu exercită nici o acţiune asupra acizilor nucleici virali respectivi a generat întrebarea dacă infecţia în herpes nu este realizată doar de corpusculi virali formaţi numai din nucleoid, fără învelişul din jur.

1. SEDIUL MULTIPLICĂRII VIRUSULUI

Aplicarea metodelor histochimice, a adsorbţiei specifice în lumină ultravioletă, a localizării elective a compuşilor marcaţi cu izotopi etc. au pus însă în evidenţă prezenţa acizilor nucleici în componentele celulei, acolo unde virusurile se multiplică după afinitatea lor (nucleară, citoplasmică sau nucleară şi citoplasmică).

Francis şi Kurtz (47) şi Ackermann şi Kurtz (1), bazaţi pe rezultatele cercetărilor lor histochimice, au considerat că virusul herpetic nu s-ar multiplica în nucleul celulei. Studiile lor, efectuate la 48 de ore de la inocularea virusului, moment în care, din punct de vedere histochimic, incluzia este Feulgen negativă, adică nu conţine nucleoproteină, i-a determinat să susţină în mod eronat acest lucru.

Ackerman şi Kurtz (1), studiind infectivitatea diverselor fracţiuni celulare, constată că 80% din virusul herpetic este prezent în fracţiunea microzomală, 16% în cea mitocondrială şi restul în cea nucleară.

Prin centrifugări diferenţiale ale suspensiilor virale Gray şi Scott (56) obţin însă rezultate care demonstrează că virusul herpetic este prezent în nucleul celulei în primul stadiu al multiplicării sale.

Acest fapt a fost demonstrat în mod elegant de către Morgan, Ellison, Rose şi Moore (112), Wyckoff şi colab. (220) cu ajutorul microscopului electronic. Autorii descriu în cursul evoluţiei infecţiei prezenţa în nucleu a unor particule mici, greu de diferenţiat de componentele normale ale nucleului, altele de dimensii uniforme cu un conţinut dens (40 — 50 mμ) înconjurat de o singură membrană în jur şi cu un diametru de 70 — 100 mμ; ulterior acestui stadiu de evoluţie a infecţiei, se observă apariţia în citoplasmă de particule în majoritate cu dublă membrană în jur şi cu un diametru de 120 — 130 mμ.

După aceşti autori ar exista o dezvoltare progresivă a particulei virale herpetice; trecerea de la particulele mici greu de diferenţiat de componentele normale ale nucleului se face în mod treptat către particule cu una şi două membrane în jur.

Lebrun (91), aplicînd tehnica anticorpilor fluorescenţi, obţine rezultate ce demonstrează că antigenul viral apare în celulele HeLa infectate cu virus herpetic mai întîi în nucleu, avînd aspectul unor grămezi mici fluorescente, separate unele de altele; într-un stadiu mai tardiv al infecţiei fluorescenţa nucleară dispare şi este evidenţiată în citoplasma celulei.

Scanned with OKEN Scanner

Ross şi Orlans (156) decelează, de asemenea cu ajutorul anticorpilor fluorescenţi, apariţia în nucleu a antigenului viral la 16 — 18 ore de la infecţie. Urmărind evoluţia antigenului, autorii constată în orele următoare prezenţa unor mase fluorescente de aspect rotund sau neuniform, care umplu treptat tot nucleul celulei. Concomitent cu aceste aspecte de imunofluorescenţă apare degenerescenţa celulară cu nuclei neregulaţi, burjonaţi, ai căror nucleoli măriţi de volum şi veziculari se fragmentează şi dispar. Din acest moment granulele fluorescente apar în citoplasmă în vecinătatea membranei nucleare, iar cîteva ore mai tîrziu fluorescenţa nucleară dispare, ea devenind foarte abundentă în citoplasma celulei. După autor, în această fază apare incluzia intranucleară tipică infecţiei herpetice.

Roizman (150), folosind aceeaşi tehnică de lucru, constată apariţia precoce a antigenului viral pe membrana nucleară şi ulterior acumularea lui în citoplasmă. Datele aduse de autori confirmă faptul că antigenul viral herpetic se sintetizează în structurile asociate nucleului, înainte sau în momentul în care particulele virotice incomplete trec din nucleu în citoplasmă.

Folosind imunofluorescenţa în decelarea localizării antigenului herpetic, Mihail şi Aderca (110) constată, la 18 — 24 de ore de la inocularea virusului pe celule embrionare umane şi amniotice umane (linia FL), în interiorul nucleilor celulelor izolate sau a insulelor de 4 — 5 celule prezenţa unei fluorescenţe omogene, care umple aproape toată zona centrală a nucleilor (fig. 39); în acest interval de timp se observă puţine celule în care această fluorescenţă este prezentă atît în nucleu cît şi în citoplasmă (fig. 40).

După 36 — 48 de ore de la inocularea virusului autorii descriu prezenţa a numeroase insule în care celulele au aspecte fluorescente diferite; în unele din ele fluorescenţa este nucleară, în altele nucleară şi citoplasmică şi în fine în altele numai în citoplasmă (fig. 41).

Datele aduse de Ross şi Orlans şi de Mihail şi Aderca demonstrează că antigenul herpetic se formează iniţial în nucleu şi apoi trece în citoplasmă. Interesant pare însă faptul că incluziile care apar în interiorul plajelor de virus nu sînt fluorescente, ceea ce confirmă interpretarea dată de Nicolau şi Kopciowska (122) că plajele ce ocupă aproape întreg nucleul sînt constituite din material virotic, în timp ce incluziile ce apar în interiorul acestor plaje sînt formate din corpusculi elementari care nu sînt numai „aglutinaţi şi sudaţi în blocuri compacte" ci şi „degeneraţi de mijloacele de apărare ale celulei".

Prin metoda centrifugării diferenţiale, folosind soluţii de sucroză cu diferite molarităţi (0,25 M şi 1,8 M), Schoen, Parfanovici şi Galegov (165) obţin, din suspensiile cerebrale de la iepurii sacrificaţi la diverse intervale de timp de la inocularea intracerebrală a virusului herpetic, separarea fracţiunilor citoplasmice şi nucleare. Încercările de reproducere a maladiei cu aceste componente celulare au arătat că virusul activ din punct de vedere biologic se găseşte localizat mai ales în fracţiunea citoplasmică. Acest fapt i-a îndreptăţit pe autori să considere că formarea şi multipli-

Scanned with OKEN Scanner

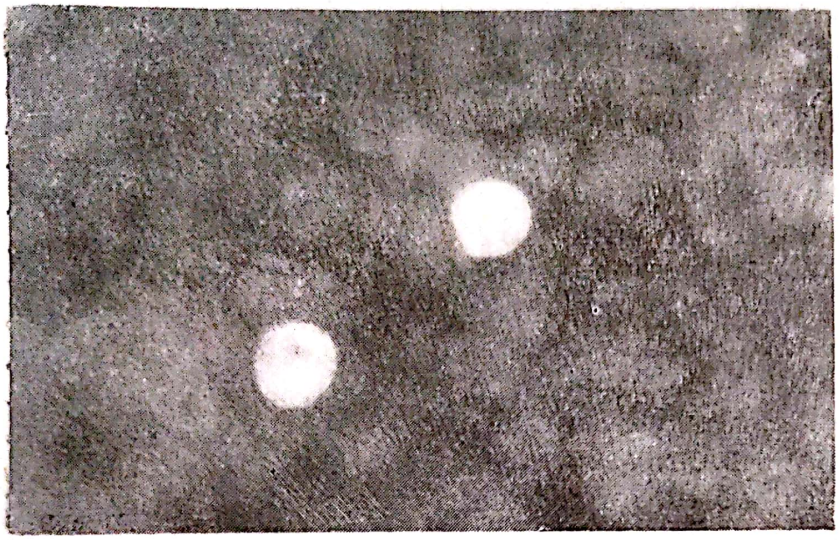


Fig. 39. — Celule embrionare umane, 18 ore de la inocularea lor cu virus herpetic. Se observă prezenţa unei fluorescenţe nucleare. Mihail şi Aderca, 1963.

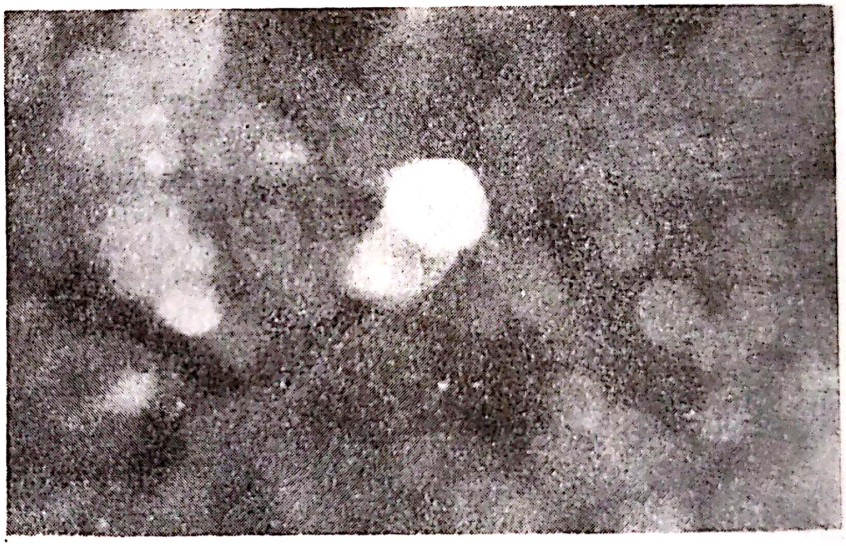


Fig. 40. — Celule embrionare umane, 24 de ore de la inocularea lor cu virus herpetic. Este prezentă fluorescenţa nucleară şi un început de fluorescenţă citoplasmică. Mihail şi Aderca, 1963.

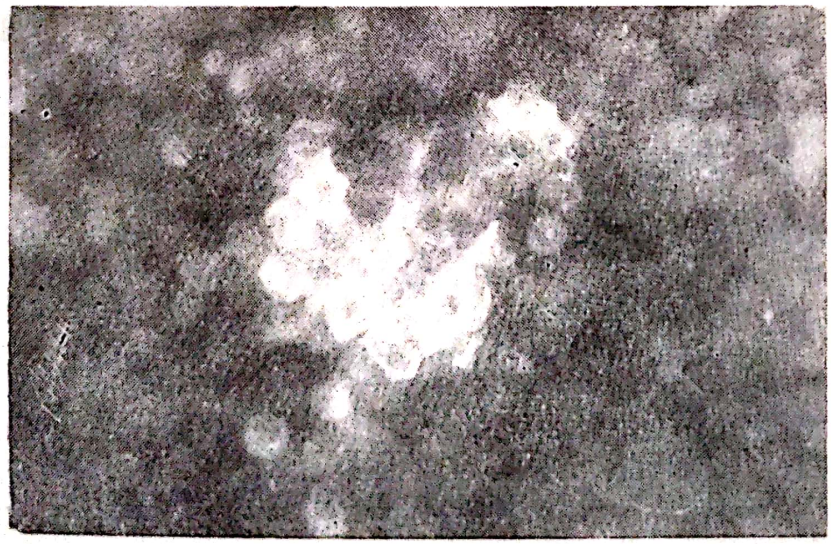


Fig. 41. — Celule embrionare umane, 48 de ore de la inocularea lor cu virus herpetic. Insulă de celule fluorescente. Mihail şi Aderca, 1963.

Scanned with OKEN Scanner

carea virusului au loc în nucleu şi că el devine infectant după trecerea lui din nucleu în citoplasmă.

Nii, Kato, Kameyama şi Kamahora (132) studiază autoradiografic celulele FL normale şi infectate cu virus herpetic *simplex*. Folosind în experienţele lor timidină tritiată ei constată o adsorbţie difuză nucleară în strictă relaţie cu reţeaua cromatiniană. Comparînd însă încorporarea timidinei marcate de către celulele normale cu aceea a celulelor infectate, autorii constată că proporţia nucleilor marcaţi este mult mai mare în celulele infectate, timidina fiind dispusă în grămezi insulare sau inelare.

Un an mai tîrziu aceiaşi autori (133) pun celulele în contact cu timidina marcată la diverse intervale de timp de la infectarea lor cu virus. În paralel studiază adsorbţia citidinei marcate cu H^3, pe care o adaugă în mediul culturii celulare la o oră de la infectarea cu virus. Rezultatele obţinute cu timidină au fost aceleaşi ca şi în experienţele anterioare. În stadiul precoce al infecţiei timidina marcată este dispusă în mici grămezi nucleare care nu au nici un raport cu nucleolii. Progresiv cu infecţia, adică la circa 6 ore de la inocularea virusului, toţi nucleii celulelor sînt marcaţi, după menţinerea timp de 2 ore de contact cu timidina tritiată. În stadiile mai tardive ale infecţiei, caracterizată printr-o marginaţie cromatiniană, granulele de timidină sînt localizate pe trama reticulară ce pare a se ataşa cromatinei condensate în jurul formaţiunilor veziculare.

În ceea ce priveşte localizarea citidinei marcate ea a fost găsită de autori în nucleolii celulelor infectate, pentru ca apoi (6 ore de la infectare), aceste grăunţe ataşate nucleolilor să se disperseze în nucleu în aşa fel încît la 8 ore de la infectare să aibă un aspect identic cu cel observat cu timidina marcată.

Aceste rezultate demonstrează în mod clar că sinteza acidului dezoxiribonucleic herpetic are loc în interiorul nucleului celulei.

2. MODIFICĂRILE NUCLEARE

Leziunile nucleolare, aranjamentul cromatinei şi prezenţa de incluzii sînt patognomonice în infecţia unei celule cu virus herpetic.

Crouse, Coriell, Blank şi Scott (28) au arătat că la 10 — 18 ore de la inocularea virusului pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, celulele au cromatina modificată ca textură şi distribuţie. La 20 de ore de la infectare, în aproximativ 40% din celulele cu incluzii, cromatina apare condensată sub formă de benzi groase aranjate la periferia nucleului; în restul celulelor cromatina este marginată. Interesant este însă aspectul tinctorial al cromatinei; după autori, ea apare Feulgen pozitivă, colorabilă cu albastru de toluidină, şi continuă să-şi menţină aceste caracteristici chiar după ce incluzia a devenit Feulgen negativă.

Înaintea apariţiei incluziei nucleolul creşte în volum de cel puţin 6 ori faţă de normal, membrana nucleolară devine Feulgen pozitivă, iar conţinutul nucleolului nu dă nici o reacţie cu fucsina bazică. Autorii con-

Scanned with OKEN Scanner

stată că o dată cu apariţia nucleotidelor dezoxiribozice nucleolare, incluzia devine Feulgen pozitivă. În acest stadiu al infecţiei cromatina are aspectul unor granule dispuse în benzi groase, foarte asemănătoare cu cele din faza precoce a infecţiei.

Prin studii histochimice, Felgenhauer şi Stammler (40) arată că virusul herpetic *simplex* inoculat pe fibroblaste de şoarece determină mai întîi leziuni în nucleoli; ei îşi pierd structura caracteristică şi nu se mai colorează în roşu cu pironină, iar cromatina se aglomerează sub aspectul descris anterior de autorii sus-menţionaţi.

Cu ajutorul microcinematografiei în contrast de fază, Barski şi Robineaux (11) constată că celulele renale de iepure infectate cu virusul herpetic *simplex* prezintă o destrămare şi dispersie progresivă a nucleolilor, o dispariţie a omogenităţii nucleoplasmei şi apariţia unei zone dense în interiorul nucleului.

Scott, Burgoon, Corriell şi Blank (172) studiază la diverse intervale de timp modificările histologice produse de virusul herpetic pe corneea de iepure. Cromatina de aspect fin granular la 2 ore de la instituirea inoculului se prezintă la 4 ore sub forma unor mase alungite condensate iar la 6 ore ia aspectul unei reţele în interstiţiul căreia se găseşte o substanţă omogenă colorată roşu-palid cu hematoxilină-eozină. Această substanţă fină, risipită la început printre benzile de cromatină, se uneşte şi formează o singură masă, care reprezintă incluzia precoce descrisă de Crouse şi colab., Feulgen pozitivă. Această masă se măreşte treptat, benzile de cromatină sînt împinse spre periferia nucleului şi constituie ceea ce autorii denumesc „marginaţie cromatiniană".

La 12 ore de la inoculare, autorii observă polimorfism lezional: unele celule prezintă în interiorul nucleului aceste mase unice omogene (incluzii precoce), altele au mai mulţi corpi omogeni printre benzile de cromatină, iar altele au aspectul observat la 2 ore de la infectare (cromatina fin granulată). La 14 ore de la infectare, pelîngă celulele cu incluziile caracteristice, autorii observă forme nucleare bizare care sugerează o diviziune amitotică sau celule cu nucleoli măriţi de volum.

Luînd în considerare faptul că Goldstein, Slatnick şi Journey (52) descriu în celulele HeLa tratate cu actinomicină D modificări ale nucleolului şi cromatinei, Nii şi Kamahora (129) studiază în paralel celulele FL tratate cu actinomicină S (concentraţie de 1 μg/ml) şi aceleaşi celule infectate cu virus herpetic *simplex*.

Celulele FL tratate cu actinomicină S (1 μg/ml) prezintă modificări nucleare (fragmentarea granulară a nucleolului şi cromatinei) identice atît cu cele descrise de Goldstein şi colab. în celulele HeLa tratate cu actinomicină D, cît şi cu cele observate în infecţia herpetică. Sub acţiunea actinomicinei S în concentraţie de 0,1 μg/ml Nii şi Kamahora observă aceleaşi modificări nucleare, unele celule avînd nucleolii dispuşi la periferia membranei nucleare şi cu halo în jur, aspect identic incluziilor produse de virusul herpetic.

Scanned with OKEN Scanner

Aspectul lezional al nucleolilor celulelor FL tratate cu actinomicină S a fost interpretat de autori ca o alterare a metabolismului ARN sub acţiunea toxică a substanţei. Cît priveşte infecţia cu virus herpetic *simplex*, autorii conchid că sinteza ADN-ului viral tulbură metabolismul ARN-ului din nucleul celulei gazde, efect reflectat în modificările morfologice descrise mai sus.

Electronooptic, Morgan şi colab. (112) (114), Reissig şi Melnick (147) şi Stoker, Smith şi Ross (188) observă în primul stadiu al infecţiei leziuni ale nucleolului constînd din fragmentarea sau transpoziţia lor, cu îngrămădirea substanţei reticulare la periferia membranei nucleare („marginaţie cromatiniană"). Nucleii apar măriţi de volum, de formă neregulată, cu restul matricei nucleare de aspect fin granulat. Prezenţa corpusculilor elementari herpetici nu a putut fi observată în acest stadiu al infecţiei, fapt explicat de autori prin localizarea lor în porţiuni necuprinse în planul secţiunii. Particule virale cu o singură membrană în jur se observă în stadiile următoare ale infecţiei. Ele sînt asociate cu substanţa reticulată care este dispusă, aşa după cum am arătat, la periferia membranei nucleare, şi sînt constituite dintr-un nucleoid (miezul central) cu un diametru de 40 mμ înconjurat de o membrană cu un diametru de 90 mμ.

Morgan şi colab. (113) observă că unele tulpini de virus herpetic *simplex* determină apariţia în nucleu a unuia sau mai multor cristale formate din particule virale, multe din ele avînd un nucleoid dens înconjurat de o singură membrană.

3. ALTERĂRILE CROMOZOMIALE

Hampar şi Ellison (63), Mazzone şi Yergamian (107) şi Stich şi Hsu (182) au demonstrat că în culturi celulare de hamster chinezesc, virusul herpetic determină anomalii cromozomiale.

Aceleaşi rezultate au fost obţinute recent de Tanzer şi colab. (197) pe explante primare de celule renale de maimuţă infectate cu virusul herpetic. Autorii constată că alterările cromozomiale, deja apărute la 17 ore, sînt maxime după 24 de ore, perioadă de timp care corespunde ciclului de multiplicare intracelulară a virusului. Lipsa leziunilor cromozomiale la loturile experimentale inoculate cu virus herpetic neutralizat cu ser antiherpetic sau modificat sub acţiunea căldurii sau razelor ultraviolete dovedesc specificitatea acestor alterări.

Stich, Hsu şi Rapp (183) descriu în celulele pulmonare de embrion uman şi de hamster chinezesc modificări în regiunea 3 a cromozomului X (fig. 42) şi în regiunea 7 a cromozomului nr. 1 (fig. 43), caracterizate prin formare de goluri ale cromatidei şi izocromatidei, modificări ce nu se găsesc la cromozomii Y.

Scanned with OKEN Scanner

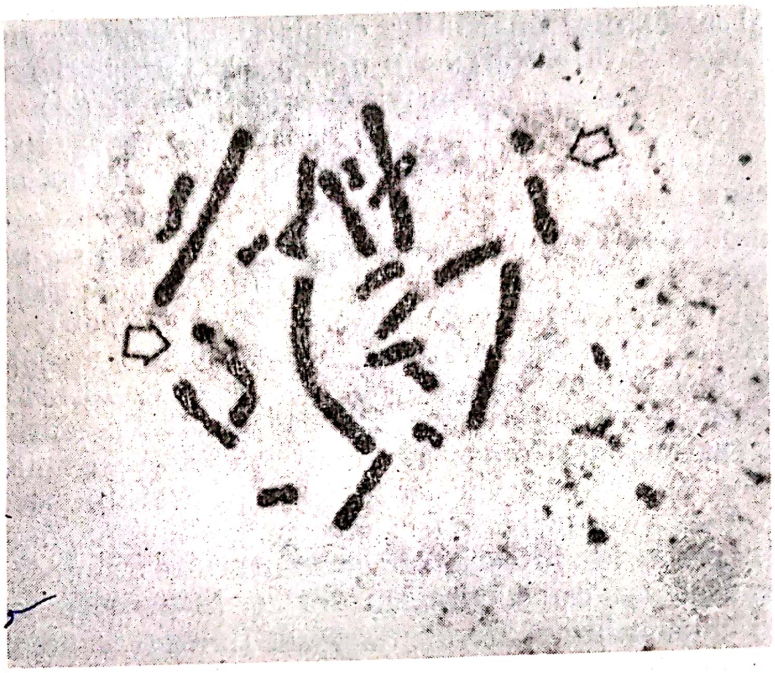


Fig. 42.—Modificări cromozomiale. Izocromatida regiunii 3 a cromozomului X prezintă goluri. Stich, Hsu și Rapp, 1964.

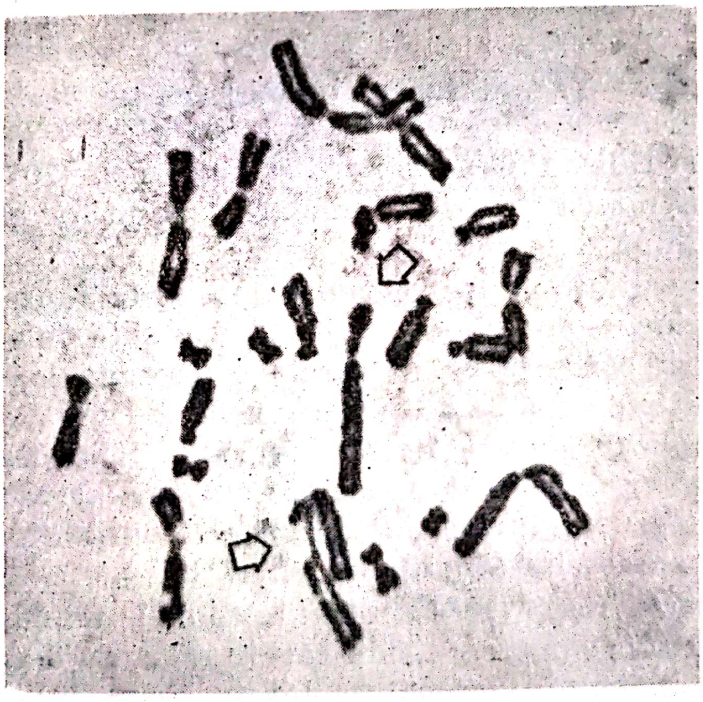


Fig. 43.—Modificări cromozomiale. Cromatidă ruptă în regiunea 7 a cromozomului nr.1. Stich, Hsu și Rapp, 1964.

Scanned with OKEN Scanner

Mecanismul prin care virusul herpetic produce aceste modificări este încă neelucidat, însă s-a constatat că ele sînt similare cu modificările găsite de Hsu şi Somers (75) în celulele hamsterului chinezesc cultivate în prezenţa a 5 bromdezoxiuridinei.

4. CELULELE GIGANTE

Prezenţa celulelor gigante (celule cu mai mulţi nuclei) a fost observată în cursul mai multor infecţii inframicrobiene (Nicolau).

Rivers, Haagen şi Muckenfuss (149) au considerat că celulele gigante din culturile de celule corneene de iepure infectate cu virusul herpetic *simplex* nu ar fi altceva decît urmarea unui fenomen de amitoză.

În cercetările lor, Scott, Burgoon, Corriell şi Blank (172), Falke (36), Kaplan şi Ben-Porat (79) constată prezenţa diviziunii amitotice în celulele infectate cu virusuri herpetice.

După Enders (35) aceste celule gigante nu ar fi decît rezultatul unei contopiri a celulelor.

Studii microcinematografice (11) au arătat că în infecţia cu virus herpetic *simplex* celulele gigante iau naştere prin fuzionarea mai multor celule şi nu printr-un mecanism de diviziune celulară.

Stoker şi Newton (186) şi Stoker (185) au dovedit că virusul herpetic împiedică diviziunea celulelor HeLa infectate şi că o singură particulă de virus este suficientă pentru aceasta.

Wildy, Smith, Newton şi Deny (218), studiind modificările citologice ale celulelor HeLa infectate cu virus herpetic *simplex*, constată o inhibiţie a mitozei celulare.

După Roizman (150), în 5 — 20% din celulele sinciţiale (gigante) determinate de virusul herpetic în celulele Hep-2 sînt prezente mitozele. În sinciţiu, celulele în interfază sau profază sînt mult mai des întîlnite decît celulele în metafază.

Tratînd celulele cu colchicină (alcaloid care opreşte mitoza celulară în metafază) cu scopul de a mări numărul de celule în metafază şi de a studia în aceste condiţii apariţia celulelor sinciţiale, autorul demonstrează că deşi în culturi existau foarte multe celule în metafază, în sinciţiu apar foarte puţine forme mitotice. S-a conchis că virusul herpetic nu blochează anafaza şi telofaza şi că celulele în interfază şi profază concură la formarea sinciţiilor.

Studiind autoradiografic modul de formare al acestor sinciţii, Nii (124) şi Nii şi Kamahova (126) (128) (131) dovedesc că pe lîngă fuzionarea celulară, iau parte şi diviziunile amitotice.

Portocală (145), studiind celulele gigante în herpesul experimental corneean, conchide că celulele gigante nu sînt adevărate celule gigante, nucleii lor avînd şi cîte o zonă citoplasmică în jur, totul fiind împresurat de o substanţă ce simulează numai citoplasma ; aceste formaţiuni gigante ce

conţin elemente epiteliale de neoformaţie, ar fi mai exact numite „pseudocelule gigante".

Portocală adaugă că „*multiplicarea celulelor epiteliale în procesul herpetic cornean se face aproape exclusiv prin amitoză*, mitozele fiind pe de o parte extrem de rare în totalitatea epiteliului, iar pe de altă parte inexistente în procesele proliferative". Acelaşi autor găseşte pseudocelulele gigante în faza incipientă (24 de ore după inoculare) a procesului de keratită şi consideră că ele traduc *o tendinţă violentă la proliferare, imprimată celulelor sensibile de virusul inoculat.*

Apariţia precoce a formelor de multiplicare amitotică în stratul epitalial abia uşor îngroşat, proliferat sub acţiunea dinamizantă a virusului herpetic cariotrop, pune la dispoziţia germenului inframicrobian un mediu de cultură extrem de favorabil. Într-adevăr, toate aceste celule neoformate conţin în nucleul lor vaste colonii de corpusculi elementari, ceea ce dovedeşte afinitatea deosebit de puternică a virusului pentru celulele tinere.

Proprietatea acestui virus de a cultiva în celulele tinere, în multiplicare activă, e cunoscută încă din 1922 (99).

Ca şi în cazul proliferărilor epiteliale din leziunile tegumentare produse de dermovaccină, virusul herpetic incintă la multiplicarea haotică celulară şi cultivă în celulele tinere, pe care le distruge treptat. Proliferarea celulară are loc însă *pînă la un anumit prag*, fiind urmată de procese de degenerescenţă şi necroză celulară sub acţiunea multiplicării masive a germenilor inframicrobieni; virusul, formînd colonii vaste, se substituie conţinutului nuclear. Aceleaşi celule epiteliale multinucleate au fost găsite în epiteliul plantar al cobaiului inoculat intradermic cu virus herpetic.

Între procesele de multiplicare intensă a epiteliului sub influenţa virusului herpetic, procesul de amitoză este evident.

S-au găsit de asemenea celule gigante în cavităţile de porencefalie descoperite în cazurile de neuroinfecţie herpetică autosterilizată nemortală. Într-adevăr, la animale (iepuri) imunizate în urma bolii experimentale vindecate, în leziunile întinse din scoarţă în special, şi în care ţesutul cerebral este înlocuit cu celule gliale de tip Rio-Hortega (celule granulo-adipoase derivate din microglie), Nicolau împreună cu Guiraud şi Kopciowska (121) au găsit unele din aceste celule microglice transformate în corpi granulo-adipoşi, cu mai mulţi nuclei. Multiplicarea acestor celule în anumite momente, sub influenţa virusului se poate face deci şi prin amitoză, celulele luînd aspect de celule gigante.

5. INDUCERE DE ENZIME ÎN CELULA GAZDĂ

Cu ocazia a numeroase cercetări s-a demonstrat că între celulele infectate cu diverse virusuri şi cele normale există o diferenţă în enzime.

Din datele aduse de Cohen (26) şi Schmidt (166) reiese că bacteriofagii induc în celula bacteriană o dezoxipolimerază şi o dezoxinucleotidkinază.

Scanned with OKEN Scanner

Green şi Pina (58), Magee (104), McAuslan şi Joklik (109), Keir şi Gold (80), Green, Pina şi Chagaya (59), McAuslan (108) etc., decelează în celulele infectate cu unele virusuri animale o creştere a activităţii enzimelor implicate în formarea precursorilor ADN-timinei.

Kit şi colab. (83), (84) au constatat că virusul herpetic inoculat pe celulele fibroblaste de şoarece (tulpina LM) şi pe o sublinie mutantă (tulpina LM (TK) induce creşterea activităţii dezoxitimidinkinazei.

Creşterea activităţii timidinkinazei a fost decelată şi de Prusoff şi colab. (146) în celulele renale de maimuţă infectate cu herpes.

Cercetările întreprinse de Keir şi colab. (81) au evidenţiat faptul că în celulele infectate cu virus herpetic activitatea ADN-nucleotidiltransferazei este mult crescută faţă de celulele normale, ea fiind de 600% în fracţiune nucleară, de 200% în cea mitocondrială şi microsomală şi de 50% în lichidul celular.

S-a demonstrat de către diverşi autori (Nohara şi Kaplan (134), Auslan (108) etc.) că între enzimele induse de virusuri şi cele obţinute din celulele normale există diferenţe fizico-chimice.

Kit şi colab. (85), studiind proprietăţile dezoxitimidinkinazei induse în fibroblastele de şoarece (tulpina LM (TK)) de virusul herpetic constată că enzima este mai puţin stabilă la inactivare termală decît aceeaşi enzimă obţinută din celulele fibroblaste de şoarece (LM (TK)) infectate cu virus vaccinal.

Cercetările întreprinse de Prusoff şi colab. (145) au demonstrat de asemeni că activitatea timidinkinazei din celulele renale de maimuţă infectate cu virus herpetic creşte linear sau aproape linear atît la 43°C cît şi la 51°C în primele 30 minute de la inoculare.

Keir şi colab. (81) căutînd să determine ADN-nucleotidiltransferaza prin măsurarea încorporării de timidin-5-monofosfat (P^{32}) din timidina-5-trifosfat ($\alpha-P^{32}$) în prezenţa 5-trifosfaţilor de dezoxiadenozină, dezoxicitidină şi dezoxiguanozină demonstrează termostabilitatea enzimei.

Odată cu descoperirea antimetaboliţilor şi a substanţelor cu rol inhibant asupra sintezei proteinelor dependente de acidul nucleic celular şi viral (actinomicină D, puromicină) s-a căutat a se stabili dacă în mecanismul lor de acţiune intervin asupra acestor enzime.

Roizman împreună cu Aurelian şi Roane (151) (152) şi Newton (119) studiind acţiunea puromicinei asupra virusului herpetic constată o inhibare a ADN prin blocarea utilizării timidinei şi ajung la concluzia că enzimele necesare utilizării timidinei apar după 2—4 ore de la inoculare şi dispar după începerea sintezei ADN-ului viral.

Cercetări întreprinse de Prusoff şi colab. (145) au demonstrat că timidina şi iododezoxiuridina, antagonistul metabolic al său, sînt fosforilate de enzimele celulei, iar acţiunea iododezoxiuridinei asupra multiplicării virusului se datoreşte inhibării uneia sau mai multor enzime.

Scanned with OKEN Scanner

6. MODIFICĂRI ALE METABOLISMULUI CELULEI GAZDĂ

În 1959, Fisher şi Fisher (42) studiază modificările metabolismului carbohidraţilor celulelor HeLa infectate cu virus herpetic *simplex* şi constată o creştere mult mai mare a acizilor organici faţă de culturile neinfectate, în cazul în care substratul principal era glucoza. Aceiaşi autori, tratînd cu cortizon culturile de celule HeLa infectate cu virus herpetic, pun în evidenţă o producere tot atît de mare de acid lactic ca şi în celulele fără cortizon şi în acelaşi timp o acumulare de acetat, piruvat şi încă a unui compus, probabil succinat; ei ajung la concluzia că utilizarea glucozei este stimulată de virus şi de cortizon în sistemul de celule HeLa, avînd ca rezultat o acumulare a produşilor intermediari ai ciclului Krebs.

Pentru a avea date mai precise, autorii mai sus-citaţi (43) extind experienţele utilizînd izotopii radioactivi (glucoză marcată cu C^{14}). Infectează de această dată celulele epiteliale nazale DMB cu cel puţin o particulă de virus herpetic (tulpina HF) pentru 4 celule DMB, în prezenţa sau în absenţa cortizonului; studiază apoi produsele rezultate din degradarea glucozei, determinînd comparativ conţinutul în C^{14} în ambele sisteme de celule, infectate şi neinfectate. Din datele obţinute, autorii ajung la concluzia că acidul lactic recuperat din aceste sisteme celulare era puternic marcat, indiferent dacă în mediu era inclusă glucoza marcată în poziţia 1 (C^{14}-1-glucoză) sau în poziţia 6 (C^{14}-6-glucoză), producerea de acid lactic în culturile infectate fiind mult mai mare comparativ cu cele martore, neinfectate. Rezultatele acestor experienţe sînt un indiciu că majoritatea lactatului acumulat este un rezultat al glicolizei. Calculînd valorile CO_2 metabolic, din sistemele de celule DMB cultivate în medii ce conţineau sau nu cortizon cît şi cele infectate cu virus în absenţa sau prezenţa cortizonului, s-a putut demonstra că activităţile specifice sau numărătorile de impulsuri/minut, per micromol de CO_2, erau mult mai mari în sistemul DMB—herpes—cortizon în experienţele în care era folosită C^{14}-1-glucoza.

Calculele activităţii specifice a CO_2 metabolic obţinute din sistemele de celule în care s-a folosit C^{14}-6-glucoză în loc de C^{14}-1-glucoză au arătat valori foarte scăzute.

Activitatea specifică ridicată a CO_2 metabolic din sistemele infectate cu virus, în care glucoza era marcată în poziţia 1 (C^{14}-1-glucoză) sugerează autorilor că în aceste condiţii este vorba de o stimulare a metabolismului „shunt" apărut cu ocazia decarboxilării C^{14}-1-glucozei.

TULPINI DE VIRUS

1. VIRULENŢA TULPINILOR

Astăzi este cunoscut faptul că diferitele tulpini de virus herpetic *simplex* nu posedă o virulenţă egală; între ele există diferenţe în ceea ce priveşte patogenitatea şi tropismul lor tisular.

Scanned with OKEN Scanner

Doerr şi Schnabel (32), Levaditi si Nicolau (100), Teissier, Gastinel şi Reilly (198), Flexner şi Amoss (44), Fontana (45), Perdrau (139) (140), Lépine şi Schoen (94) (95), Hruszek (74), Magrassi (106) şi alţii au constatat că unele tulpini de virus sînt foarte patogene şi infectante, cu un neurotropism intens, producînd în mod constant moartea iepurelui inoculat pe cornee (tulpini „forte"), iar altele determină o boală locală a corneei inoculate, asociată uneori cu uşoare fenomene nervoase deseori inaparente clinic (tulpini „slabe"). Între aceste două variante de tulpini există o gamă întreagă de virulenţe mai mult sau mai puţin accentuate.

Unele tulpini „forte" pot fi pasate indefinit pe cale cerebrală la iepure fără să-şi modifice proprietăţile patogene; altele însă, prin pasaje intracerebrale seriate la această specie animală îşi pot modifica virulenţa, atenuîndu-se (120) (101) (98) (148) (94).

Lépine (93) demonstrează însă că tulpinile „forte" a căror proprietate patogenă s-a atenuat prin trecerile cerebrale seriate la iepure pot fi din nou exacerbate patogenic prin treceri intracerebrale la maimuţă.

În ceea ce priveşte tulpinile „slabe" s-a constatat de către Nicolau şi Poincloux (123) că prin pasaje intracerebrale seriate la iepure ele se epuizează şi nu mai determină la animal nici un fenomen morbid.

Subladze şi colab. (191) constată că diferitele tulpini de virus herpetic *simplex* diferă în ceea ce priveşte atît proprietăţile patogene, cît şi modificările morfologice. Şoarecele alb infectat pe diverse căi prezintă faţă de unele tulpini de virus o sensibilitate scăzută la inocularea subcutană sau intradermică.

Cercetările lui Plummer şi Hackett (143) au demonstrat de asemenea că tulpinile M. S. (izolată de la un caz de scleroză în plăci) şi L_2 (izolată de Subladze şi colab. de la un bolnav cu catar hemoragic) de virus herpetic prezintă atît pentru iepurele cît şi pentru şoarecele infectat intramuscular (muşchiul coapsei) neurotropisme variate, prima determinînd paralizii urmate de encefalomielită mortală, iar cea de-a doua paralizii fără encefalită.

Aspecte lezionale diferite au fost observate de Subladze şi colab. şi pe culturi celulare (firoblaste de embrion de găină, celule HeLa, celule renale de porc şi celule renale de găină) infectate cu diverse tulpini de virus herpetic; pe acelaşi substrat celular, tulpini diverse de virus herpetic determină efecte citopatice şi grade de multiplicare diferite; forma, numărul şi localizarea incluziilor în aceste celule variază cu tulpina de virus inoculată.

Aceeaşi neasemănare a aspectului lezional între diversele tulpini a fost observată de autori şi prin inocularea pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat.

Chu şi Warren (25), studiind 4 tulpini de virus herpetic *simplex*, constată diferenţe între ele, atît în ceea ce priveşte efectul citopatic pe care-l determină pe celulele renale de iepure, cît şi în ceea ce priveşte patogenitatea lor pentru embrionul de găină şi şoarece.

Autorii observă în plus că tulpinile de virus inoculate în culturi celulare şi intracerebral la şoarece sînt mult mai antigenice decît aceleaşi tulpini cultivate în embrionul de găină.

Munk şi Fischer (117), studiind prin tehnica imunofluorescenţei mai multe tulpini de virus herpetic *simplex*, constată diferenţe în ceea ce priveşte localizarea imunofluorescenţei (fig. 44); aceste diferenţe nu au fost însă observate la tulpinile care determină acelaşi efect citopatic, aşa încît deosebirile existente din punct de vedere biologic între tulpinile de virus concordă cu datele obţinute prin tehnica imunofluorescenţei.

2. ANTIGENITATEA TULPINILOR

Cu toate că între tulpini există diferenţe în ceea ce priveşte patogenitatea şi tropismul lor tisular, s-a crezut că din punct de vedere antigenic toate tulpinile de virus herpetic *simplex* sînt identice.

Burnet şi Lush (20), studiind două tulpini diferite de virus herpetic *simplex*, constată însă că între ele nu există diferenţe antigenice semnificative.

S-a sugerat însă de către unii autori că între tulpinile de virus nu ar exista o asemănare absolută, omul imunizat faţă de una din tulpini putînd face o nouă infecţie cu o alta.

Slavin şi Gavett (177), comparînd tulpina LH de virus izolată din leziuni vulvo-vaginale herpetice cu tulpina HF adaptată la creierul de şoarece, constată existenţa diferenţelor antigenice.

Florman şi Trader (46), studiind 4 tulpini de virus herpetic *simplex* de diverse origini, demonstrează prin reacţia de seroneutralizare efectuată pe şoarece şi pe membrana corioalantoidă, că 3 din tulpinile proaspăt izolate sînt identice din punct de vedere antigenic pe cînd cea de-a 4-a (adaptată pe şoarece) este numai parţial neutralizată de către serurile anti preparate cu primele 3 tulpini; testul de neutralizare pe membrana corioalantoidă este mult mai satisfăcător decît cel efectuat pe şoarece, pentru evidenţierea acestor diferenţe antigenice între tulpini. După autori, diferenţele antigenice sînt însă paralele cu patogenitatea tulpinilor pentru diversele specii gazdă.

Kilbourne şi Horsfall (86), efectuînd reacţii de neutralizare pe şoarecele nou-născut, nu pot decela diferenţe antigenice semnificative între cele două tulpini de virus herpetic studiate.

Scanned with OKEN Scanner

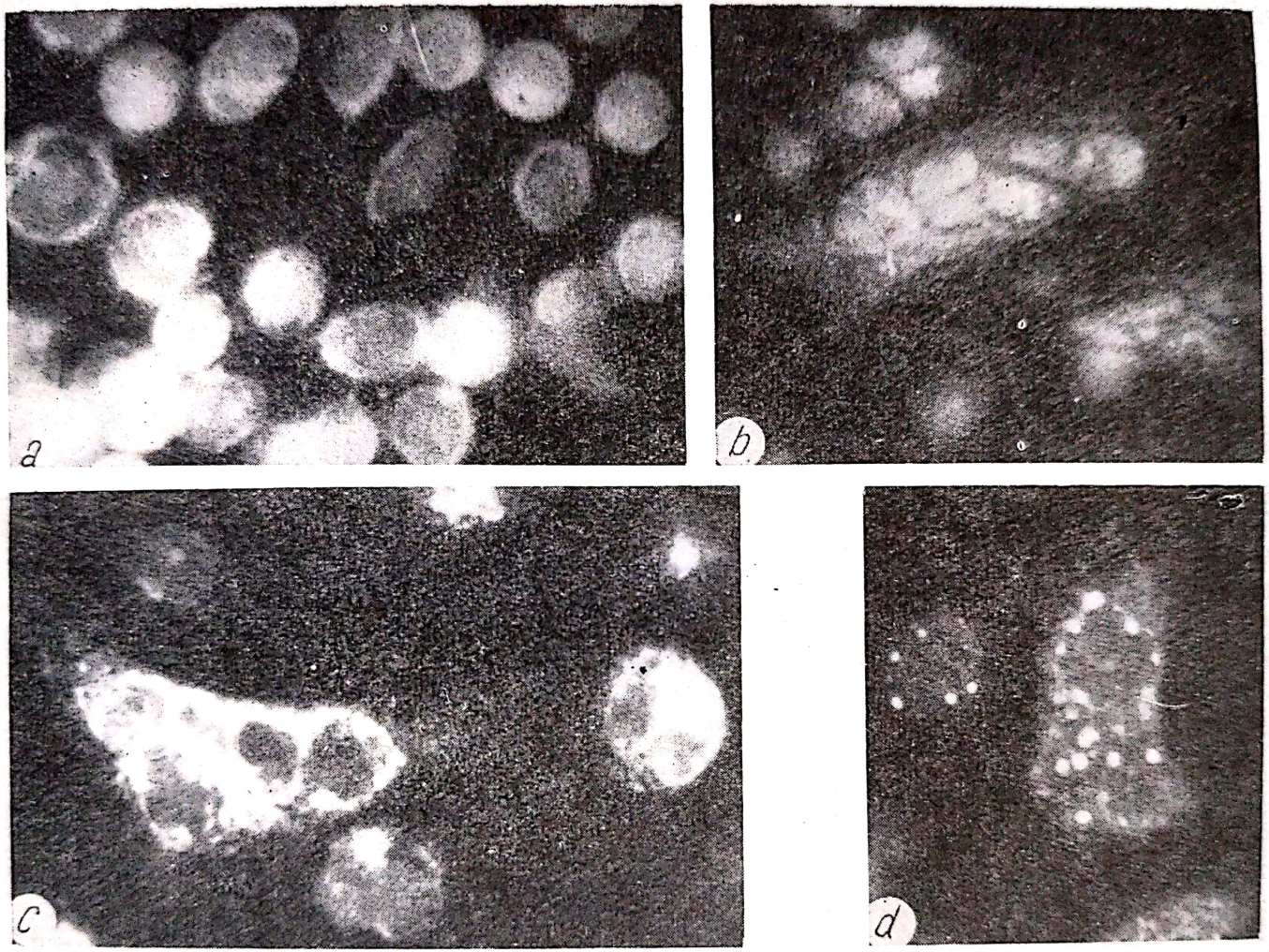


Fig. 44. — Celule HeLa, 24 de ore de la inocularea lor cu diverse tulpini de virus herpetic.
a. Fluorescență redusă a interiorului nucleului, mai intensă la periferia nucleului, și absentă în citoplasmă (tulpina Wal. de virus).
b. Fluorescență intensă a interiorului și periferiei nucleului; absența fluorescenței în citoplasmă (tulpina Hof. de virus).
c. Fluorescență redusă în interiorul nucleului și intensă la periferia nucleului; citoplasma celulei, fluorescent „granulată" (tulpina Armstrong).
d. Aceleași granule fluorescente la periferia nucleului (tulpina Armstrong). Munk și Fischer, 1965.

Scanned with OKEN Scanner

Prin testul de fixare a complementului, Womack şi Hunt (219) demonstrează de asemenea existenţa unor oarecare diferenţe antigenice între tulpinile de virusuri herpetice studiate.

Folosind reacţiile de fixare a complementului şi de seroneutralizare pe membrana corioalantoidă, nici Hayward (65) nu obţine rezultate din care să reiasă existenţa vreunei diferenţe antigenice între cele 4 tulpini cercetate.

Rezultatele obţinute de Jawetz şi colab. (77) atît prin testele de seroneutralizare efectuate pe ouă de găină embrionate în vîrstă de 7 zile, inoculate intravitelin, şi pe şoarece adult inoculat intracerebral, cît şi prin testele de protecţie încrucişată, au demonstrat că cele 11 tulpini de virus herpetic studiate prezintă variaţii antigenice ce pot permite o oarecare separare a lor.

Prin testul de seroneutralizare încrucişată faţă de serul homolog şi heterolog, Garabedian şi Syverton (48) constată că între cele 4 tulpini de virus herpetic izolate de la un individ ce prezentase 4 recidive de herpes nu există nici o deosebire antigenică, titrul mare al anticorpilor seroneutralizanţi la acest individ neavînd nici un rol în prevenirea apariţiei leziunilor recidivante.

Subladze şi Huan Cji-San (190), studiind cu ajutorul reacţiei de seroneutralizare încrucişată 9 tulpini proprii de virus herpetic *simplex*, izolate de la bolnavi cu leziuni herpetice şi 3 din tulpinile izolate încă din 1949 de către Gaidamovici, au observat că ele prezintă diferenţe antigenice ce aparţin la 3 tipuri diferite de virus.

Rezultatele obţinute de Schneweis şi Brandis (171) şi Müller şi colab. (115) au demonstrat de asemenea că tulpinile de virus herpetic *simplex* sînt diferite din punct de vedere antigenic.

Schneweis (169) (170), bazat pe rezultatele obţinute prin reacţiile de seroneutralizare şi fixare a complementului, împarte tulpinile de virus herpetic în două subtipuri. Aceste două subtipuri cu o fracţiune antigenică comună se deosebesc prin aceea că subtipul 2 prezintă o componentă antigenică care lipseşte la celălalt subtip. Subtipul 1 determină în culturi celulare aspect de microplaje (mici focare de celule rotunde), iar subtipul 2 aspect de macroplaje (sinciţii); pe membrana corioalantoidă subtipul 1 induce apariţia leziunilor de dimensiuni mici în comparaţie cu subtipul 2 care determină leziuni de dimensii mari.

Aceste rezultate au fost apoi confirmate şi de Roizman şi Roane (153) (154). Autorii constată diferenţe între ele atît în ceea ce priveşte cromatografia pe coloană de „bruşită", cît şi în ceea ce priveşte densitatea în gradient de CsCl.

Studiind relaţiile serologice ale tipului 1 şi 2 de virus herpetic *simplex* cu virusul herpetic B (*simiae*), Schneweis (169) nu decelează însă nici o relaţie antigenică între ele.

Scanned with OKEN Scanner

3. STRUCTURA ANTIGENICĂ

a) *Componente fixatoare de complement.* Hayward (64) izbuteşte să izoleze în pericada de multiplicare a virusului herpetic *simplex* un antigen solubil.

În 1953, Brown (15) separă prin ultracentrifugarea virusului herpetic două componente antigenice : *a*) componenta V, prezentă în sediment şi deci asociată particulei virale şi *b*) componenta S prezentă în supernatant (solubilă).

După Scott şi col. (173) şi Modi şi Tobin (111) nu este încă dovedit în mod cert dacă antigenul solubil precede apariţia virusului infectant. Cercetările de microscopie fluorescentă întreprinse de Lebrun (91) au evidenţiat prezenţa unei fluorescenţe intranucleare la un anumit stadiu al infecţiei herpetice, însă fără a putea spune dacă aceasta este datorită corpusculilor elementari sau antigenului solubil.

Un fapt dovedit în mod cert este că componenta S (antigenul solubil) are proprietate fixatoare de complement care dispare dacă produsul este încălzit la 60° şi determină după administrarea intradermică o reacţie de hipersensibilitate cutanată indiferent dacă a fost sau nu supusă la temperatura de 60°C.

Căutînd a decela prezenţa anticorpilor fixatori de complement în serurile umane faţă de cele două componente antigenice V şi S obţinute din culturile celulare de rinichi de iepure şi din creierul de şoarece sugar, infectate cu virus herpetic *simplex*, Balducci şi colab. (8) ajung la concluzia că serurile umane reacţionează pozitiv numai cu componenta antigenică V, demonstrînd prin aceasta dualitatea acestor două componente.

Lippelt şi Söltz-Szöts (103) izbutesc de asemenea să prepare din membranele corioalantoide ale oului de găină şi din celulele amniotice umane infectate cu virus herpetic *simplex* antigene corpusculare (V) şi solubile (S) cu ajutorul cărora studiază în dinamică prezenţa anticorpilor fixatori de complement la cobaii infectaţi pe cale intraperitoneală, intranazală sau subcutană din suspensie 10% de creier virulent de şoarece. Anticorpii fixatori de complement apar în sîngele cobailor la aproximativ o săptămînă de la administrarea virusului, cresc la un titru maxim pînă la 5 săptămîni, după care scad treptat. Faptul interesant constatat de autori este că anticorpii anti-V ating titruri mai ridicate şi persistă o perioadă mai lungă de timp decît cei anti-S. Reiese însă din aceste cercetări că dispariţia anticorpilor anti-S după 9 săptămîni de la infectare ar coincide cu scăderea rezistenţei cobailor, cu toate că anticorpii anti-V persistă încă într-un titru destul de ridicat. Aceste rezultate i-au determinat pe autori să considere că reacţia de fixare a complementului cu antigenul solubil (S) este cea mai indicată în studiul imunităţii.

Cercetînd serurile cobailor imunizaţi cu virus herpetic *simplex*, Söltz-Szöts (179) constată că deşi titrurile anticorpilor fixatori de complement faţă de antigenul S scad aproape complet, reinfecţia în acest moment poate fi posibilă.

Scanned with OKEN Scanner

Acelaşi autor constată, în serurile recoltate de la indivizi cu herpes recidivant, o corelaţie între titrul anticorpilor fixatori de complement faţă de antigenul S şi apariţia unei recidive; ea este precedată deseori de scăderea acestor anticorpi, titrul menţinîndu-se ridicat faţă de antigenul V.

În cercetările sale, Artzet (7) separă de asemenea prin ultracentrifugare cele două componente şi demonstrează că antigenul S este de natură proteică (constanta de sedimentare S20 = 4,25 unităţi Svedberg). În continuarea cercetărilor, Delsal şi Artzet (31) izbutesc să separe, prin cromatografie pe coloană de dietilaminoetil celuloză (DEAE) partea fixatoare de complement de cea infectantă.

Russell, Gold, Keir, Omura, Watson şi Wildy (159) observă că antigenul fixator de complement apare în celule înainte ca particulele infectante să poată fi detectate.

Schneweis (170), studiind structura antigenică a virusului herpetic *simplex*, pune în evidenţă, pe lîngă componentele antigenice V (componentă legată de virus şi influenţată de căldură şi raze ultraviolete) şi S (componentă solubilă), o componentă antigenică neutralizantă (N) tot solubilă, care este însă foarte sensibilă la căldură şi rezistentă la ultraviolete.

Müller şi colab. (115) utilizează în studiul anticorpilor fixatori de complement 3 tipuri de antigene denumite G, V şi S. Primul antigen (G) este obţinut prin centrifugarea lichidului de cultură de celule renale de iepure infectate cu virus herpetic, recoltat în momentul cînd efectul citopatic este maxim; antigenele V şi S sînt obţinute prin metodele folosite şi de ceilalţi autori, din lichidele şi membranele corioalantoide a ouălor de găină infectate cu acest virus.

Investigaţiile serologice efectuate de autori la 13 cobai inoculaţi intraperitoneal sau intracerebral cu virus herpetic au arătat o creştere a titrului anticorpilor fixatori de complement faţă de toate aceste antigene. Totuşi s-a putut demonstra că anticorpii fixatori de complement faţă de antigenul G sînt detectaţi mult mai devreme decît cu antigenul V şi au titruri mult mai ridicate. Nu s-a observat nici o diferenţă între anticorpi faţă de antigenele V şi S.

Cercetînd seruri recoltate de la bolnavi cu diverse manifestări neurologice, autorii găsesc la 4 din 204 indivizi investigaţi o creştere a titrului anticorpilor faţă de antigenul G; anticorpii fixatori de complement au fost însă prezenţi în 82 de cazuri studiate (40%).

Falke (38) fracţionează o suspensie de virus herpetic cu ajutorul gradienţilor de densitate de CsCl şi coloanelor schimbătoare de ioni şi caută să facă o asociere între activitatea biologică şi diferitele dimensii de particule. Atît prin centrifugare în gradienţi de densitate (fig. 45) cît şi pe coloană schimbătoare de ioni (fig. 46) separă o fracţiune infectantă şi activă în reacţia de fixare a complementului şi o alta activă serologic însă foarte puţin infectantă. Prima conţine în special particule cu înveliş, capsidă şi nucleoid (particule complete) şi are o densitate de 1,254, cea de-a doua

Scanned with OKEN Scanner

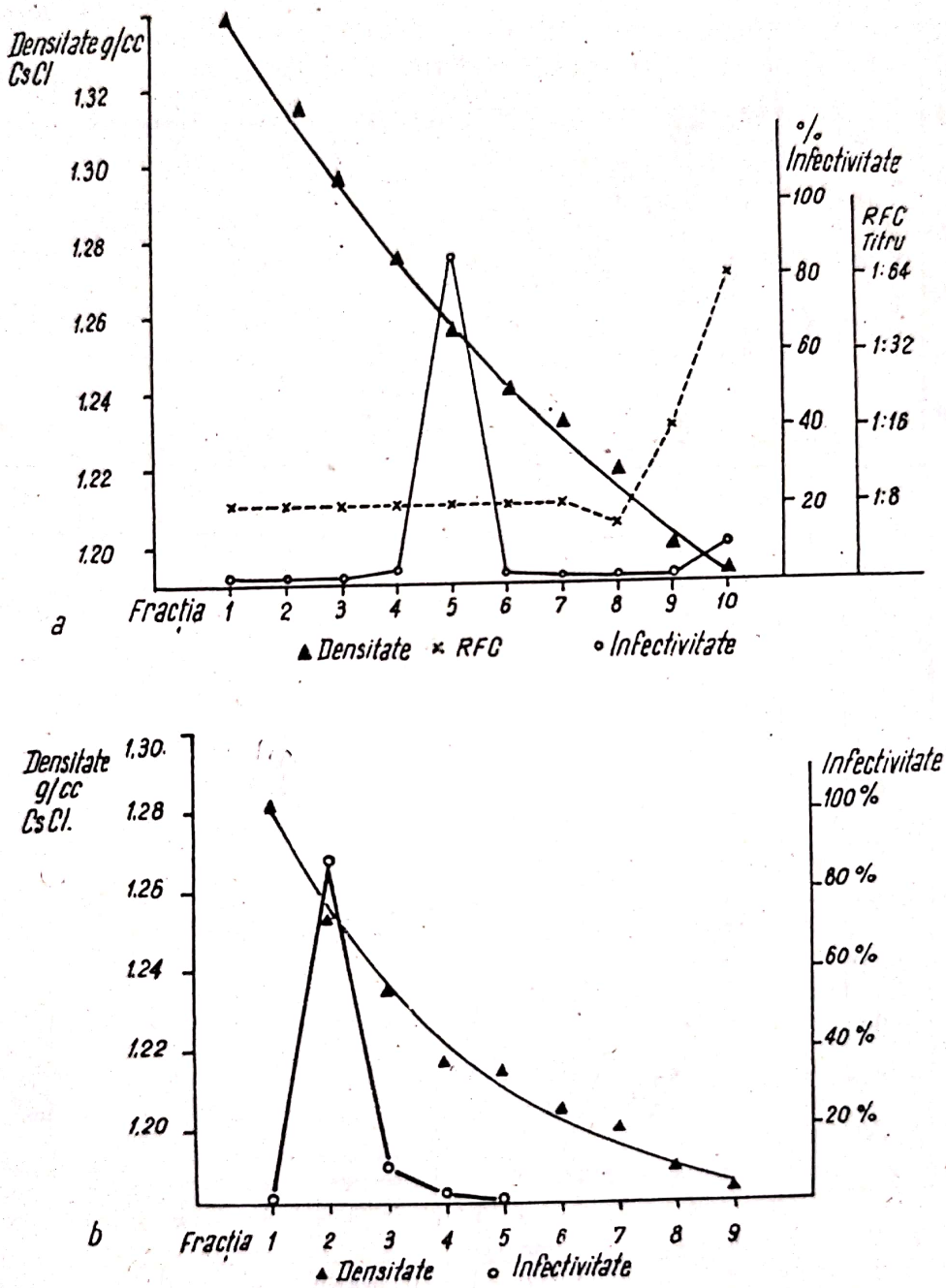


Fig. 45. — *a*. Virus herpetic *simplex* (tulpina Lennette) centrifugat în gradient de densitate. Se constată prezența componentei infectante în fracția 5 (densitate 1,254), iar cea fixatoare de complement în fracția 10.
b. Recentrifugarea fracției infectante. Activitatea maximă e prezentă în fracția 2 (densitate 1,254). Falke, 1965.

Scanned with OKEN Scanner

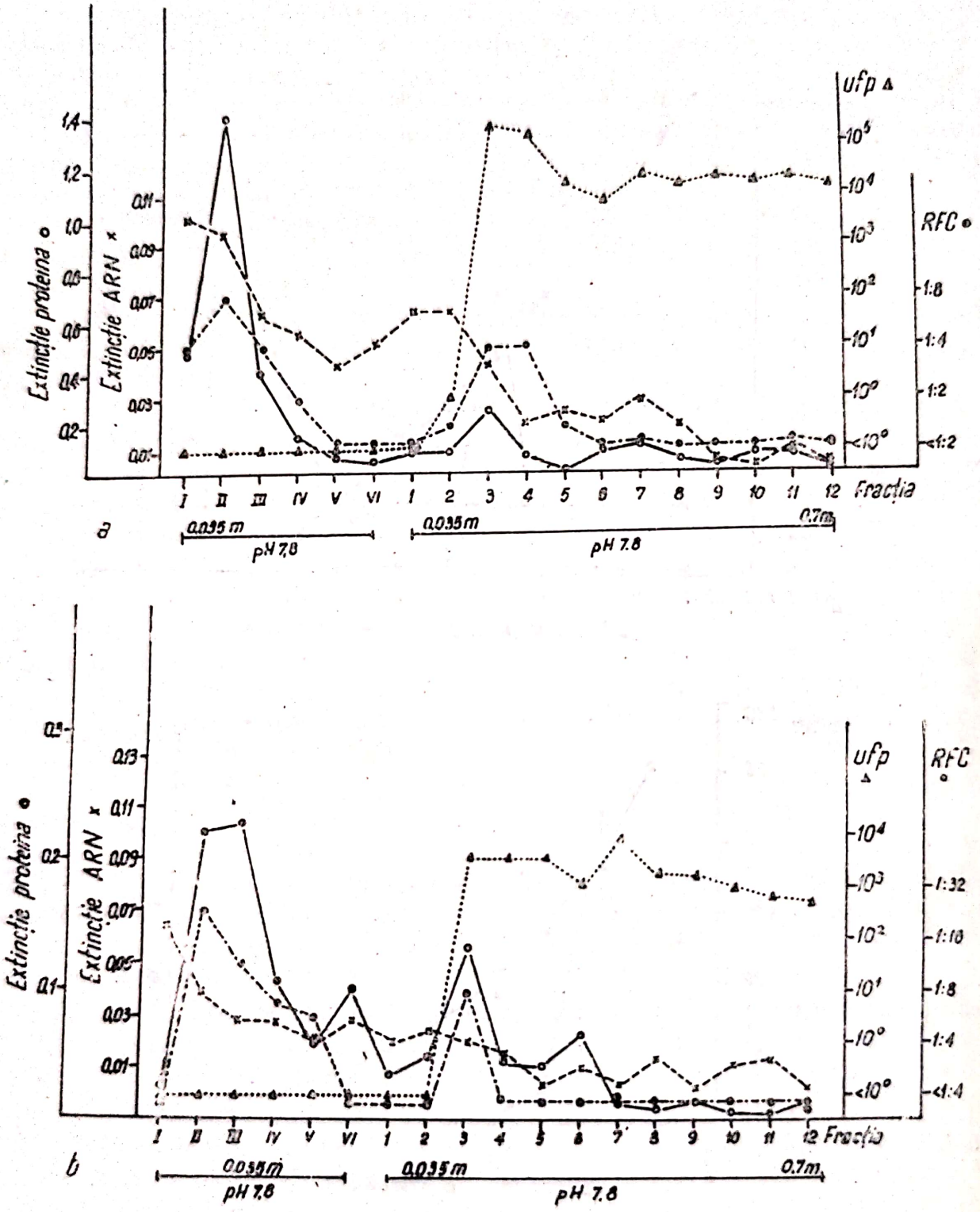


Fig. 46. — *a*. Cromatografia pe coloană de ECTEOLA a supernatantului de cultură celulară infectată cu virus herpetic; se constată eluarea a 3 maxime de ARN şi 2 maxime ale activităţii fixatoare de complement. Începînd cu fracţia 3 apare infectivitatea. Proteina se elueză cu activitatea fixatoare de complement.

b. Cromatografia fracţiei 10 după separare în gradiente prin ultracentrifugare. Activitatea fixatoare de complement este eluată în mare parte; începînd de la fracţia 3 se elueză o parte mai mică odată cu infectivitatea. Falke, 1965.

Scanned with OKEN Scanner

are o densitate de 1,130 sau mai puţin, este foarte heterogenă şi conţine alături de particulele complete, capside şi corpi veziculoşi fără structură determinată (fig. 47).

b. *Componente precipitante.* Tokumaru (200), utilizînd DEAE—Sefadex şi centrifugări în gradient de densitate de CsCl,

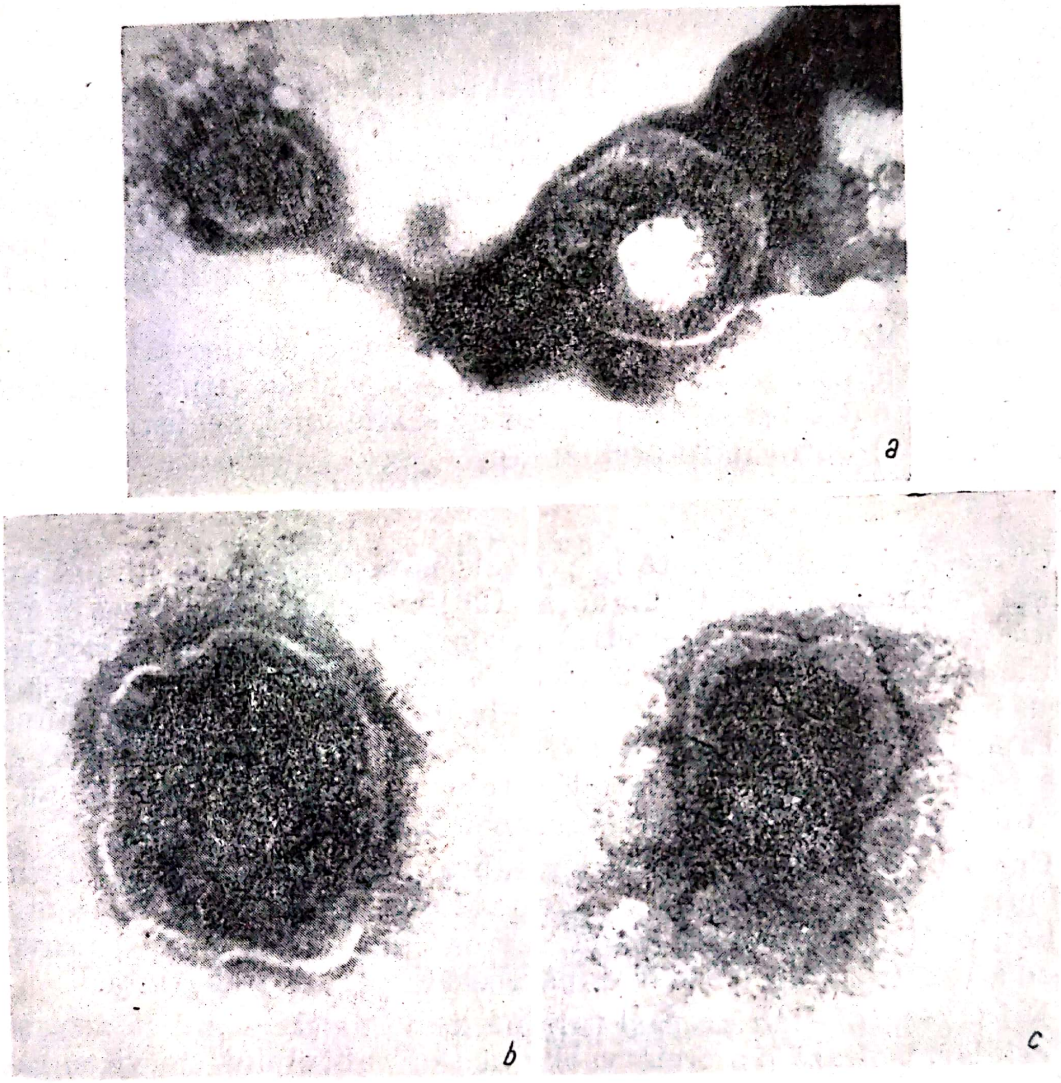


Fig. 47.— Imagini electronooptice ale fracţiilor infectante şi fixatoare de complement. Unii din corpusculii elementari cu o dimensie de aproximativ 150 — 180 mμ, sînt capsidaţi şi au un înveliş.

demonstrează existenţa în suspensiile de virus herpetic *simplex* a 4 antigene precipitante (unul viral şi 3 solubile) legate de suprafaţa particulei virale.

Aceste antigene diferă între ele prin dimensia particulelor, prin viteza difuziei în gel, prin densitatea, prin comportarea cromatografică, mobilitatea electroforetică şi prin susceptibilitatea faţă de diverşi agenţi fizici şi chimici.

Antigenele solubile inoculate la cobai sînt capabile să determine apariţia anticorpilor neutralizanţi şi să blocheze acţiunea anticorpilor neutralizanţi din serul bolnavilor convalescenţi.

4. VARIANTE DE VIRUS

Numeroşi autori (163) (172) (164) (78) au studiat multiplicarea virusului herpetic *simplex* în culturi celulare de diverse provenienţe.

Recent, Gray şi colab. (57) obţin pe celule HeLa trei tipuri de efect citopatic produse de virusul herpetic *simplex* : proliferativ (P), neproliferativ (NP) şi celule gigante (CG). Primul tip se caracterizează prin prezenţa de celule rotunde, cel de-al doilea prin prezenţa de celule mici şi cel de-al treilea prin prezenţa de sinciţii.

Scott şi McLeod (174), cercetînd răspunsul celular faţă de infecţia cu virus herpetic *simplex*, diferenţiază două tipuri de virus, unul formator de celule gigante (CG) şi altul formator de celule mici, negigante (N). Nii şi Kamahora (125) obţin date asemănătoare cu o tulpină de virus herpetic *simplex* izolată din lichidul veziculelor recoltat de la un individ cu herpes labial.

Cu această tulpină, care la primele pasaje producea numai apariţia de celule rotunde, Nii şi Kamahora (126) fac pasaje succesive pe celulele amniotice umane (FL) în monostrat şi constată, după 40 de pasaje apariţia de celule gigante cu numeroşi nuclei. Pasajele efectuate din diluţia limită de virus au dus la obţinerea a două subtulpini de virus ce determină, una numai apariţia de celule gigante (CG+) şi cealaltă numai modificări citopatogene fără formarea de celule gigante (CG—). Subtulpinile nu au putut fi însă diferenţiate prin testele de seroneutralizare.

Curbele de creştere a ambelor subtulpini s-au dovedit a fi similare, totuşi prima (CG+) provoacă o cantitate maximă de virus în 16 ore de la inoculare pentru ca apoi să scadă, iar cea de-a doua (CG—) provoacă o creştere a cantităţii de virus şi după această perioadă de timp.

Nii (124), folosind aceeaşi tulpină de virus (Myama) şi acelaşi substrat celular, izolează o a treia variantă sau subtulpină de virus care determină apariţia de celule fuziforme care se aglomerează, fără însă să formeze celule sinciţiale.

Pe celule HeLa şi celulele L ale lui Earle tulpina CG+ produce aceleaşi celule gigante ca şi pe celule FL ; pe celule L, care curînd de la infecţie prezintă leziuni caracterizate prin spargerea lor, sinciţiile (celulele gigante) formate nu sînt însă atît de mari.

Prin pasaje succesive ale virusului herpetic *simplex* pe culturi de celule FL în prezenţa serului uman ce conţine anticorpi herpetici, Hoggan şi Roizman (70) obţin două variante ale acestui virus, deosebite prin comportarea lor în culturi ; e vorba de varianta microplajă (mP), izolată în primele pasaje, şi varianta macroplajă (MP) izolată după 20 de pasaje.

Scanned with OKEN Scanner

Prima determină pe culturi celulare, în prezența serului anti, apariția de mici plaje, iar cea de a doua apariție de plaje mari (4 — 5 mm în diametru) cu prezență de celule gigante.

Autorii constată că cele două variante de virus, deosebite între ele prin dimensia plajelor, dau efecte citopatice caracterizate prin apariția de celule rotunde (variante mP) și respectiv de sincitii (varianta MP).

Faptul interesant observat de acești autori este acela că cele două variante ale aceluiași virus se comportă, în absența anticorpului specific, de aceeași manieră atît pe culturile de celule FL cît și pe membrana corio-alantoidă a oului de găină embrionat.

Hoggan, Roizman și Roane (71) constată că tulpina MP de virus herpetic *simplex* produce în cultura de celule FL discrete plaje înconjurate de celule gigante numai dacă mediul conține 2,5 — 20% ser uman sau 10 — 20% ser de cal.

Prin testele de neutralizare autorii nu au putut însă pune în evidență nici o diferență antigenică între tulpinile MP și mP de virus herpetic *simplex*. Folosind colorația acridine—orange și hematoxilină—eozină, nu constată nici o diferență între cele două tulpini în ceea ce privește efectul citopatic și prezența de incluzii.

Colorațiile cu anticorpi fluorescenți au arătat că prelungirile citoplasmice observate pe preparatele infectate cu varianta mP nu prezintă o fluorescență specifică, ceea ce-i determină pe autori să discute rolul posibil pe care l-ar avea aceste procese în răspîndirea mai eficientă a virusului variantei MP.

Prin sedimentare în CsCl, Roizman și Roane (71) constată că virionul acestor două variante este diferit. Aceiași autori (72) studiază apoi cromatografic diferențele existente în structura suprafeței și observă că modelul eluției virionului mP și MP sînt distincte (fig. 48).

Din punct de vedere antigenic s-a dovedit prin testul de neutralizare că cele două variante sînt asemănătoare însă nu identice. Studiul acțiunii inactivante a eterului, cloroformului sau ureei nu a putut detecta diferențe între aceste variante.

Modelul eluției pe coloană de brușită și reactivitatea imunologică obținute de autori atestă existența unor diferențe în structura suprafeței virionilor și în compoziția capsidei și învelișului.

Scott, McLeod și Tokumaru (175) compară din punct de vedere biologic două tulpini de virus herpetic (CG și P) care se deosebesc între ele prin efectul citopatic pe care-l produc; în mod constant prima (CG) determină celule gigante sincițiale, iar cea de-a doua (P) rotunjirea și îngrămădirea celulelor cu cîteva mici celule gigante însă fără sincitii. Cu ocazia acestui studiu, autorii constată că : *a*) multiplicarea virusului este similară la ambele tulpini, virusul nou format fiind prezent în lichidul de cultură în 5 — 7 ore de la inoculare; *b*) ambele sînt inactivate prin căldură în aceeași perioadă de timp (perioada de înjumătățire fiind de o oră și jumătate la 37° și de 3 ore și 48 min la 30°—31°C); *c*) ambele sînt inactivate de

razele ultraviolete în acelaşi ritm cu perioada de înjumătăţire de 7 secunde; *d*) ambele au aceeaşi perioadă de adsorbţie sau pătrundere; *e*) ambele sînt identice din punctul de vedere al patogenităţii pentru animale, al antigenităţii şi al dimensiei corspusculilor elementari.

Comparînd o tulpină formatoare de sinciţii (tulpina MPF) şi una formatoare de celule gigante mici (tulpina HF), Wheeler (210) constată

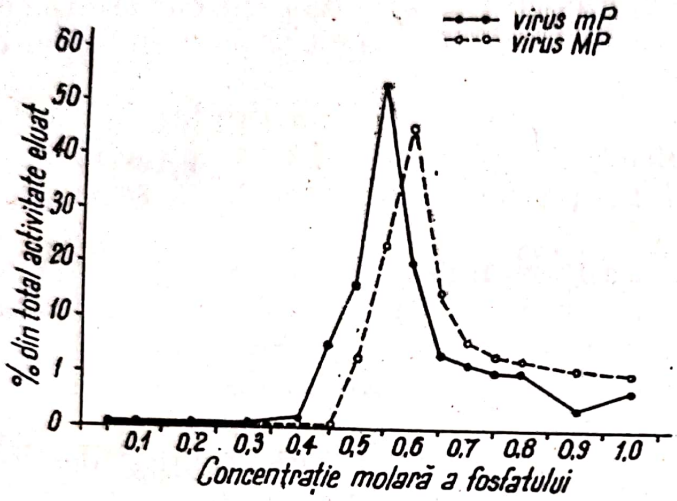


Fig. 48. — Diferenţe în structura de suprafaţă a variantelor MP şi mP de virus herpetic *simplex*. Roizman şi Roane, 1963.

că prima este mai puţin virulentă pentru şoarece, iepure şi membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, însă mult mai rapid inactivată de căldură. La 35°C autorul nu constată nici o diferenţă între aceste tulpini în ceea ce priveşte multiplicarea virusului. În pasaje seriate ambele tulpini s-au dovedit a fi stabile din punctul de vedere al efectului citopatic.

Hinze şi Walker (68) obţin de asemenea în culturi celulare o variantă a virusului herpetic *simplex*. Inoculînd tulpina HF de virus herpetic în culturi de celule HeLa, KB şi celule conjunctivale umane (celulele lui Chang) al căror mediu de creştere conţine ser uman cu titru mic de anticorpi herpetici, aceşti autori izbutesc să obţină pentru o perioadă foarte lungă de timp culturi persistent infectate. Ei au constatat însă că prin îndepărtarea serului uman din mediul de creştere, celulele sînt total distruse de virus.

După 6 luni de la infectarea liniilor de celule s-a observat o variaţie a caracterului obişnuit al acestui virus (focare de celule rotunde cu cîteva celule gigante) caracterizată prin apariţia focarelor de tip proliferativ. În absenţa serului uman cu anticorpi herpetici această variantă determină leziuni citopatogene identice cu tulpina iniţială.

Pe celule Chang, varianta de virus se multiplică mult mai mult decît tulpina iniţială de virus.

Deşi prin reacţia de neutralizare nu au fost puse în evidenţă diferenţe antigenice între această variantă şi tulpina iniţială, s-a constatat totuşi că varianta este mai puţin virulentă pentru şoarece şi că virulenţa sa scade

treptat, pierzînd apoi capacitatea de a se mai multiplica în creierul de şoarece.

Ţinînd seama de faptul că Scott şi colab. au constatat că suspensiile de virus herpetic conţin populaţii de corpusculi elementari ce determină 2 sau 3 feluri de efecte citopatice, Hinze şi Walker consideră că modificările pe care le-au obţinut sînt un rezultat al selecţiei.

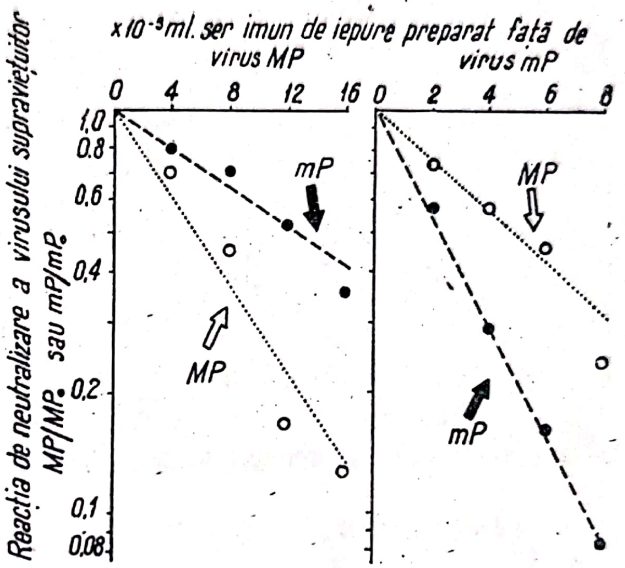


Fig. 49. — Diferenţe serologice (reacţia de seroneutralizare) între variantele MP şi mP de virus herpetic *simplex*. Roizman şi Roane, 1963.

Faptul că aceste tulpini îşi păstrează caracterul lor lezional în cursul pasajelor l-au determinat pe Schneweis (167) (168) să considere că este vorba de o transformare genetică a tulpinilor în relaţie cu structura lor antigenică şi comportarea serologică.

Studiind cele două variante de virus pe care Hoggan şi Roizman le-au diferenţiat, Roizman şi Roane (153) (154) arată că între ele există într-adevăr diferenţe serologice (fig. 49) şi că ele pot fi uşor separabile prin cromatografia pe bruşită şi ultracentrifugare în gradient de CsCl, fapt ce-i determină să considere că este vorba de o diferenţă a proprietăţilor suprafeţei (capsidă sau înveliş) acestor două virusuri.

Studiile lui Kohlhage şi Siegert (90) demonstrează că tulpina „JES" de virus conţine două variante genetice care determină pe celule HeLa două tipuri de celule gigante : fR şi rR (fig. 50). Aceste variante inoculate intracerebral la şoarece se comportă diferit (fig. 51), ceea ce, după autori, n-ar fi în legătură cu diferenţa în intensitatea multiplicării ci cu diferenţa calitativă a particulelor de virus. Ambele variante au calităţi antigenice asemănătoare şi rezistă la aceeaşi temperatură şi acelaşi pH.

Kohlhage (88) obţine de asemenea din tulpina „JES" de virus herpetic *simplex* varianta de plaje fR şi rR şi constată prin centrifugareîn gradient de densitate CsCl o diferenţă de densitate între ele de 0,6% (fig. 52), iar prin cromatografie pe coloană de ECTEOLA, o eluţie diferită (fig. 53).

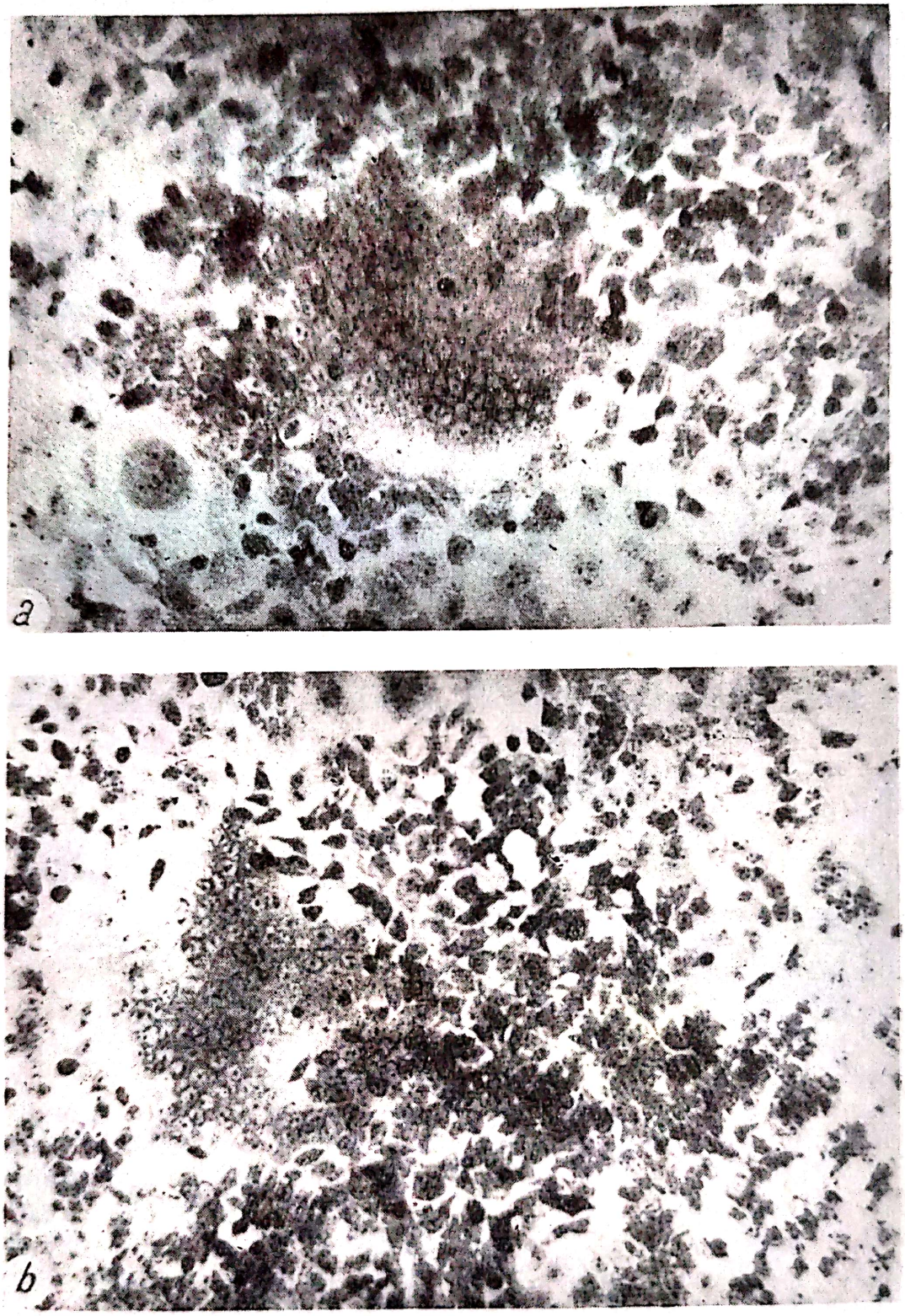


Fig. 50. — Variante de virus herpetic *simplex* (tulpina „JES").
a. Varianta tip fR pe celule HeLa, 30 de ore de la infectare.
b. Varianta tip rR pe celule HeLa, 30 de ore de la infectare. Kohlhage și Siegert, 1962.

Scanned with OKEN Scanner

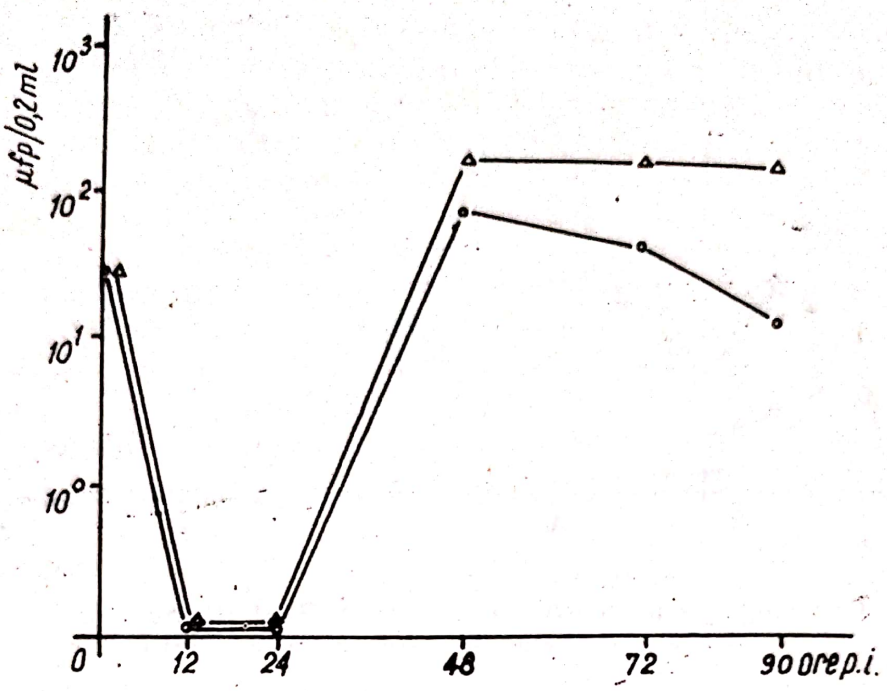


Fig. 51.— Curbele multiplicării variantelor fR şi rR de virus inoculate intracerebral la şoarece. Kohlhage şi Siegert, 1962.

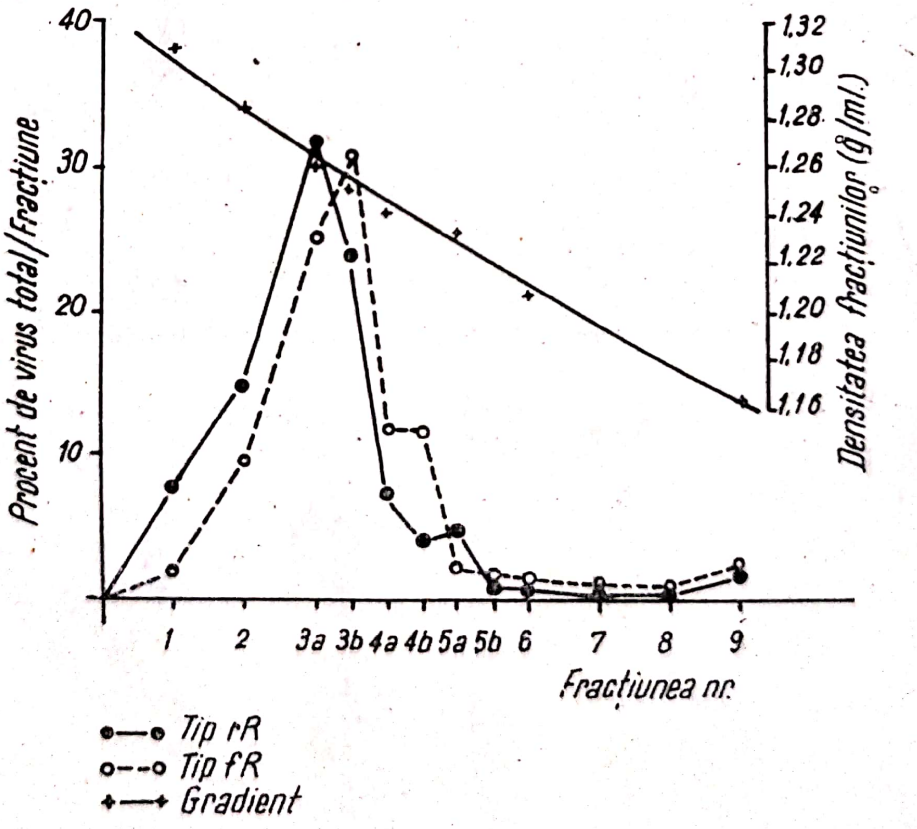


Fig. 52. — Centrifugarea variantelor fR şi rR în gradient de densitate de CsCl. Se observă conţinutul în virus al fracţiilor izolate. Kohlhage, 1964.

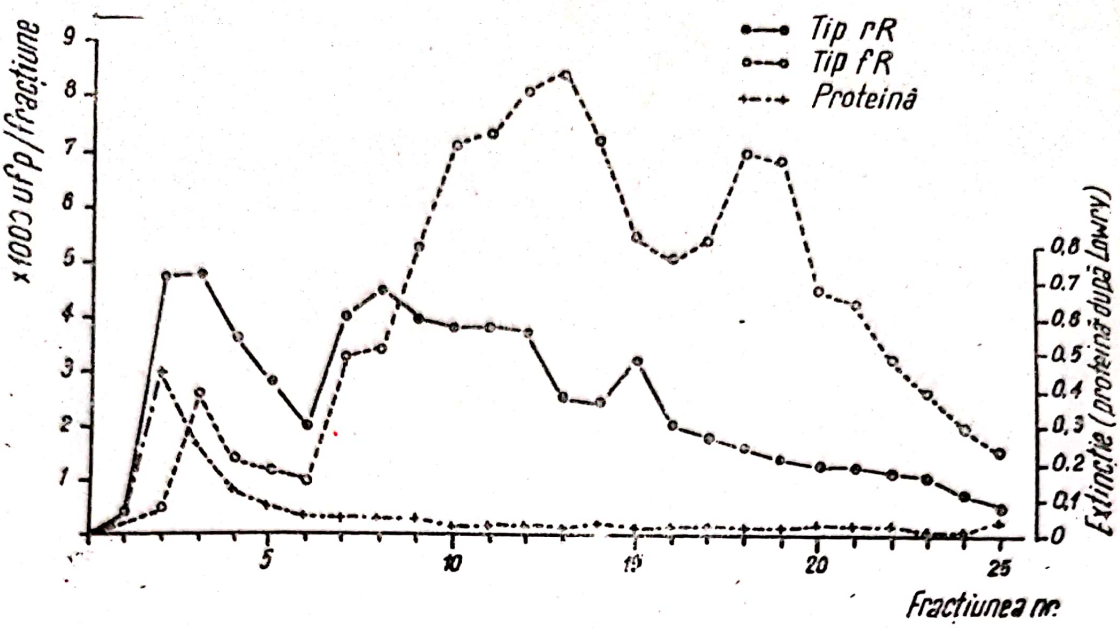


Fig. 53. — Cromatografia pe coloană a variantelor fR și rR. Se constată eluția diferită a variantelor de virus. Kohlhage, 1964.

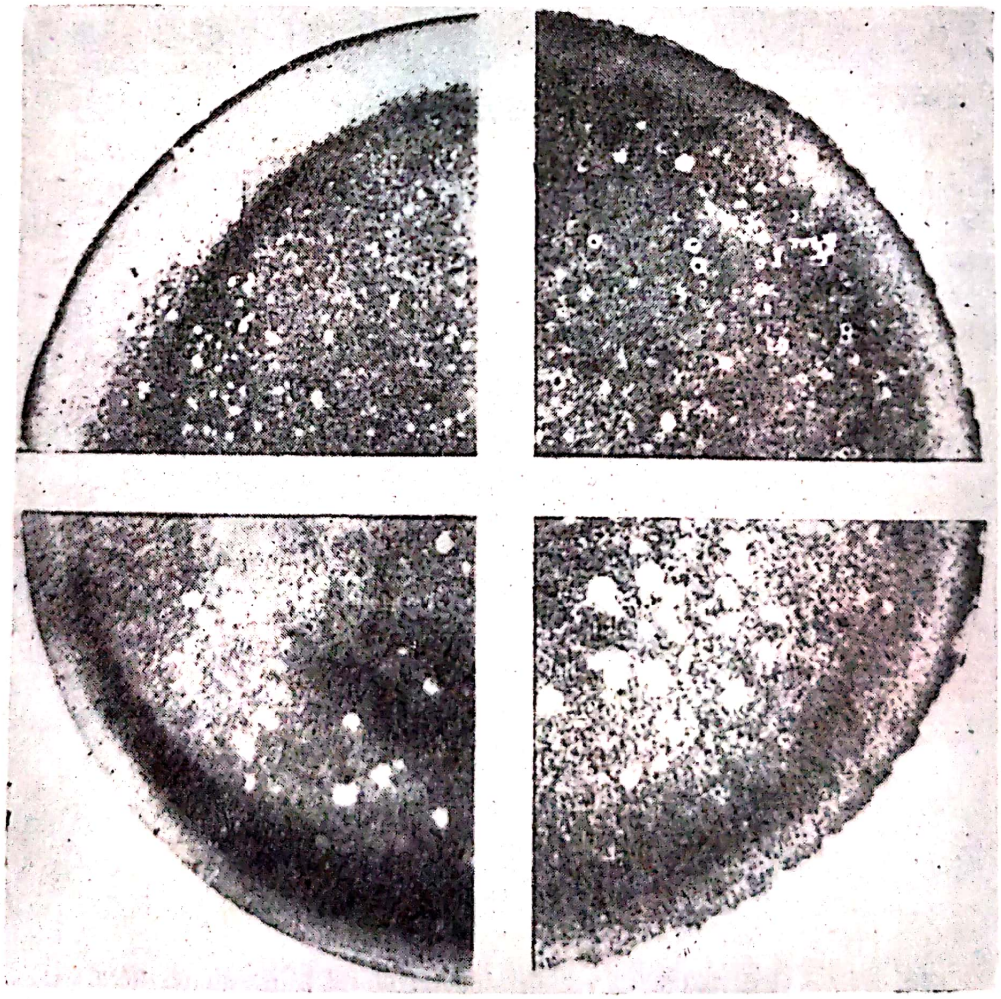


Fig. 54.—Plaje de virus. În stînga sus, plaje mici de virus. În dreapta sus precum și stîngă și dreapta jos, plaje mari de virus. Munk și Donner, 1963.

Scanned with OKEN Scanner

Munk şi Donner (116), aplicînd metoda lui Dulbecco şi Vogt, parţial modificată, la studiul virusului herpetic *simplex* folosind soluţia Hanks (fără roşu fenol), 0,9 g% agar (Difco), 0,138 g extract de drojdie de bere (Difco), 0,10 g% hidrolizat de lactalbumină, 0,15 g% $NaHCO_3$, 10% ser de viţel, penicilină şi streptomicină, obţin două tipuri de plaje de virus: plaje mici şi mari (fig. 54), ce corespund efectului citopatic produs de tulpinile de virus folosite în culturi în monostrat. Aceste plaje sînt, după autori, caracteristice genetice ale tulpinilor şi aspectul lor permite o diferenţiere a tulpinilor de virus herpetic *simplex*.

Utilizînd p-fluoro-fenilalanina, care are proprietatea de a bloca multiplicarea virusului infectant permiţînd însă inducerea de sinciţii, Falke (37) izbuteşte să separe puterea formatoare de sinciţii de cea infectantă.

5. MUTANTE DE VIRUS

Nojima (135), studiind o tulpină „Sk" de virus herpetic *simplex* izolată de la un bolnav cu erupţie variceliformă Kaposi constată după 6 pasaje pe membrana corioalantoidă, că virusul îşi menţine acelaşi titru pe oul de găină embrionat infectat pe această cale şi pe şoarecele sugar inoculat intracerebral sau intraperitoneal. Continuînd pasajele pe membrana corioalantoidă, autorul obţine între pasajele 19 şi 25 o scădere a patogenităţii virusului pentru şoarecele sugar inoculat în special intraperitoneal; la pasajul 62, patogenitatea virusului pentru iepurele inoculat pe corneea în prealabil scarificată diminuă, însă în măsură mult mai mică decît pentru şoarecele sugar.

Autorul constată însă că tulpina de virus atenuată prin cele 62 de pasaje pe membrana corioalantoidă, trecută în 4 pasaje succesive pe cale intracerebrală la şoarecele sugar îşi recapătă virulenţa sa pentru şoarece.

Cercetînd în paralel o altă tulpină de virus (tulpina HF) autorul nu izbuteşte să modifice virulenţa sa, cu toate că efectuează 400 de pasaje în oul de găină embrionat. Acest fapt îl determină pe autor să considere că prin pasaje succesive (19 — 25) pe membrana corioalantoidă se obţine o mutantă a tulpinii „SK" de virus herpetic.

Cercetînd pe celulele renale de iepure comportarea a 13 tulpini de virus herpetic *simplex* proaspăt izolate, Kohlhage şi Schieferstein (89) constată că toate aceste tulpini determină pînă la pasajul IV acelaşi efect citopatic caracterizat printr-o rotunjire a unei celule (EZ = *Einzelzellabkugelund*) pentru ca apoi (de la al IV-lea pasaj), toate tulpinile să inducă pe lîngă acest aspect lezional şi un altul caracterizat prin apariţia de celule gigante (RZ = *Riesenzellbildung*) (fig. 55). Apariţia acestui fenomen a fost considerat de autori ca o mutantă a tulpinii EZ şi nu ca o selecţie din amestecul acestor două tipuri. Trecerile acestor două tipuri pe celule HeLa şi pe clone de celule HeLa nu au determinat în cele 11 pasaje efectu-

Scanned with OKEN Scanner

ate decît apariţia tipului de leziune EZ. Inocularea celulelor renale de iepure cu o diluţie limită de virus a dus la izolarea unui tip pur de leziune RZ care pe celule HeLa şi pe clone de celule HeLa nu a fost capabilă să determine decît un efect citopatic EZ.

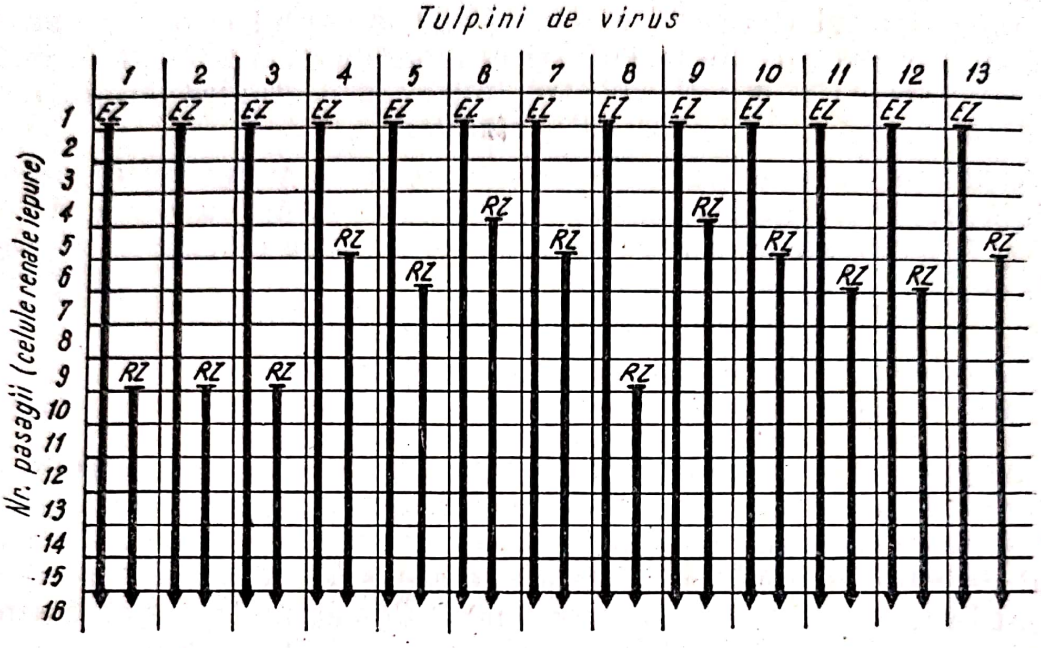


Fig. 55. — Efecte citopatice apărute în cursul pasajelor pe celule renale de iepure. *RZ*, celule gigante; *EZ*, celule rotunde izolate. Kohlhage şi Schieferstein, 1965.

Aceste rezultate i-au determinat pe autori să considere că efectul citopatic depinde de genotipul virusului însă este modificat în expresia sa fenotipică de celula gazdă.

6. RECOMBINĂRI DE VIRUS

Wildy (217) încearcă să vadă dacă virusul herpetic *simplex* în condiţii similare celorlalte virusuri studiate (30) (66) (19) (69) (141) se recombină.

Autorul studiază 6 tulpini de virus (Eri, HFE, HFEM, Sch, Nag şi W C) care se deosebeau între ele prin comportarea lor atît pe oul de găină embrionat (tipul de leziuni produs, gradul de multiplicare a virusului infectant şi de viteza de adsorbţie a virusului pe celulele de membrană corioalantoidă) cît şi pe animale (şoareci inoculaţi intracerebral sau iepuri inoculaţi pe corneea scarificată).

Primele 4 din aceste tulpini produc pe membrana corioalantoidă leziuni opace de dimensii mari (1 — 15 mm în diametru), iar ultimele două, leziuni mici (pînă la 0,5 mm în diametru). În ceea ce priveşte gradul lor de multiplicare, tulpinile producătoare de leziuni opace mari prezintă

creşteri de 100 ori mai mari decît cele producătoare de leziuni mici ; viteza de ataşare a virusului pe membrana corioalantoidă, studiată la 30, 60 şi 120 min de la infectare, prezintă însă doar mici variaţii de la o tulpină la alta. Inoculate intracerebral la şoarece, tulpinile ce determină leziuni mari pe membrana corioalantoidă produc o encefalită cu sfîrşit letal, pe cînd celelalte sînt apatogene. Aceleaşi diferenţe au fost observate de autor şi în ceea ce priveşte comportarea lor pe iepure.

Cu două din cele 6 tulpini de virus (una din primul grup, iar cealaltă din cel de-al doilea grup) care s-au arătat a fi neutralizate de acelaşi ser anti, autorul studiază posibilitatea unei recombinări. La o oră de la inocularea pe membrana corioalantoidă a tulpinii de virus a cărei viteză de ataşare era mai înceată, autorul inoculează cea de-a doua tulpină. După o oră de menţinere a ouălor la 35°, inoculează 0,5 ml ser anti, iar la 6 ore (timp în care virusul matur apare) recoltează membranele corioalantoide pe care, după spălări în soluţie salină, le foloseşte pentru prepararea suspensiilor necesare inoculărilor intracerebrale la şoarece şi pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat.

După tipul leziunilor produse la şoarece şi pe membrana corioalantoidă, autorul izbuteşte să izoleze 10 clone de virus unele din ele asemănătoare, după tipul leziunilor produse, cu una din cele două tulpini iniţiale. Aceste clone s-au dovedit a avea pentru şoarece o virulenţă intermediară celor două tulpini iniţiale. Leziunile corneene la iepure şi viteza de fixare a virusului pe membrana corioalantoidă au fost asemănătoare cu acelea ale tulpinilor iniţiale. După 3 — 5 pasaje, autorul constată o stabilizare a caracteristicilor clonelor obţinute.

BIBLIOGRAFIE

1. Ackermann, W. W., Kurtz, H. B. — J. exp. Med., 1952, *96*, 151.
2. Aderca, I., Ianconescu, M., Bîrcă, A. — St. cerc. inframicrobiol., 1960, *11*, 243.
3. Aderca, I., Iftimovici, M. — St. cerc. inframicrobiol., 1963, *14*, 749.
4. Anderson, K. — Science, 1939, *90*, 497.
5. Anderson, K. — Amer. J. Path., 1940, *16*, 137.
6. Andrewes, C. H. — J. Path. Bact., 1930, *33*, 301.
7. Artzet, F. — *Recherches sur les antigènes viraux fixant le complément. Étude des virus herpétiques et poliomyélitique.* Thèse Sciences, Paris, 1961.
8. Balducci, D., Tyrell, D. A. J., Harris, C. H. St. —Arch. ges. Virus forsch., 1956, *7*, 28.
9. Barski, G., Lamy, M., Lépine, P. — Ann. Inst. Pasteur, 1955, *89*, 415.
10. Barski, G., Maurin, J., Lépine, P. — Ann. Inst. Pasteur, 1949, *76*, 221.
11. Barski, G., Robineaux, R. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1959, *101*, 632.
12. Beveridge, W. I. B., Burnet, F. M. — Med. Res. Counc. Spec. Rep., 1946, nr. 256.
13. Bickerstaff, E. R. — J. Path. Bact., 1953, *66*, 391.
14. Black, F. L., Melnick, J. L. — J. Immunol., 1955, *74*, 236.
15. Brown, J. A. H. — Brit. J. exp. Path., 1953, *34*, 290.
16. Burnet, F. M. — Med. Res. Counc. Spec. Rep., 1936, nr. 220, H. M. Stationery Office, London.
17. Burnet, F.M. — Brit. J. exp. Path., 1940, *21*, 147.
18. Burnet, F. M. — *Principles of animal virology*, Academic Press, New York, 1955, p. 34.
19. Burnet, F. M., Froser, K. B., Lind, P. E. — Nature, 1953, *171*, 163.

Scanned with OKEN Scanner

181. Sosa-Martinez, J., Gutierrez-Villegas, L., Sosa, R. M. — J. Bact., 1955, *70*, 391.
182. Stich, H. F., Hsu, T. C. — J. Cell Biol., 1963, *19*, 67 A.
183. Stich, H. F., Hsu, T. C., Rapp, F. — Virology, 1964, *22*, 439.
184. Stoker, M. G. P. — Nature, 1958, *182*, 1525.
185. Stoker, M. G. P. — Symposium Soc. Gen. Microbiol., 1959, 9*th*, 142.
186. Stoker, M. G. P., Newton, A. A. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959, *81*, 129.
187. Stoker, M. G.P., Ross, R. W. — J. gen. Microbiol., 1958, *19*, 250.
188. Stoker, M. G. P., Smith, K. M., Ross, R. W. — J. gen. Microbiol., 1958, *19*, 244.
189. Stulberg, C. S., Shapira, R. — J. Immunol., 1953, *70*, 51.
190. Subladze, A. K., Huan Chi-Hsiang — Voprosi virusol., 1959, *1*, 80.
191. Subladze, A. K., Maevskaya, T. M., Vanag, A. I. — Voprosi virusol., 1961, *3*, 286.
192. Szántó, J. — Acta virol., 1960, *4*, 380; 1963, *7*, 385.
193. Szántó, J. — Čsl. Epidemiol. Microbiol. Immunol., 1961, *10*, 1,
194. Takemoto, K. R., Lerner, A. M. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1957, *94*, 179.
195. Taniguchi, H. — Jap. J. Med. Sci. Biol., 1958, *11*, 169.
196. Taniguchi, H., Yoshino, K. — Arch. ges. Virusforsch., 1964, *14*, 535.
197. Tanzer, J., Thomas, M., Stoitchkov, Y., Boirou, M., Brnard., J. — Ann. Inst. Pasteur, 1964, *107*, 366.
198. Teissier, P., Gastinel, P., Reilly, J. — C. R. Soc. Biol., 1922, *86*, 73.
199. Tytell, A. A., Neuman, R. E. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1963., *113*, 343.
200. Tokumaru, T. — J. Immunol., 1965, *95*, 189.
201. Uchida, Y. — Jap. J. Ophtal., 1961, *5*, 254.
202. Vantis, J. T., Wildy, P. — Virology, 1962, *17*, 225.
203. Verdi, G. P., Serra, C. — Biol. Oculist. Ital., 1959, *38*, 705.
204. Waterson, A. P. — Arch. ges. Virusforsch., 1959, *8*, 592.
205. Watkins, J. F. — J. gen. Microbiol., 1960, *22*, 40.
206. Watkins, J. F. — J. gen. Microbiol., 1960, *22*, 57.
207. Watson, D. H., Wildy, P. — Virology, 1963, *21*, 100.
208. Wheeler, C. E. — J. Immunol., 1958, *81*, 98.
209. Wheeler, C. E. — J. Immunol., 1960, *84*, 394.
210. Wheeler, C. E. — J. Immunol., 1964, *93*, 749.
211. Wheeler, C. E., Canby, C. M. — Arch. Dermat., 1959, *79*, 86.
212. Wheeler, C. E., Canby, C. M. — J. Immunol., 1959, *83*, 392.
213. Wheeler, C. E., Canby, C. M. — J. Bact., 1960, *79*, 658.
214. Wheeler, C. E., Canby, C. M., Cawley, E. P. — J. Invest. Derm., 1957, *29*, 383.
215. Wheeler, C. E., Harvie, Jr., E. J., Canby, C. M. — J. Invest. Derm., 1961, *36*, 89.
216. Wildy, P. — Austr. J. exp. Biol. med. Sci., 1954, *32*, 605.
217. Wildy, P. — J. gen. Microbiol., 1955, *13*, 346
218. Wildy, P., Smith, C., Newton, A. A., Deny, P. — Virology, 1961, *15*, 486.
219. Womack, C. R., Hunt, B. P. — Science, 1954, *120*, 227.
220. Wyckoff, R. W. G., Croissant, O., Lépine, P. — Ann. Inst. Pasteur, 1956, *90*, 18.
221. Yoshino, K. — J. Immunol., 1956, *76*, 301.
222. Yoshino, K., Taniguchi, H. — Jap. J. med. Sci. Biol., 1956, *9*, 303.
223. Yoshino, K., Taniguchi, H., Taniguchi, S. — Virology, 1960, *10*, 97.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 2

INFECȚIA EXPERIMENTALĂ

HERPESUL EXPERIMENTAL LA ANIMAL

A. INOCULAREA LA ANIMALELE DE EXPERIENȚĂ

1. IEPURELE

Iepurele este foarte sensibil față de infecția cu virus herpetic. Primele experiențe de transmitere a bolii la această specie animală, prin inoculări pe corneea scarificată a produsului recoltat de la un individ cu herpes corneean, au fost făcute acum jumătate de secol de către Grüter.

După această descoperire, confirmată apoi de Kraupa, s-a demonstrat de către Löwenstein (114) că aceeași leziune corneeană la iepure poate fi obținută prin inocularea lichidului prelevat atît din veziculele herpetice cutanate, cît și din erupția de herpes genital.

Concomitent cu aceste descoperiri, Doerr și Vöchiting (31) constată că iepurele inoculat pe cornee cu produse herpetice face nu numai o cheratită, ci și fenomene encefalitice urmate de comă și sfîrșit letal.

Deși cercetările lui Löwenstein au demostrat susceptibilitatea uniformă a iepurilor față de acest inframicrob, Levaditi și Harvier (94), Bruni (18) etc. au arătat totuși că aceste animale au o susceptibilitate inegală față de aceeași tulpină de virus.

După Szymanowski și Zand (183) și Goodpasture (63), iepurii tineri sînt cei mai sensibili la infecția herpetică experimentală. Bruni (18) demonstrează faptul că iepurii slabi sau prost hrăniți sînt foarte receptivi față de virusul herpetic.

a. *Inocularea intracerebrală.* Calea de inoculare intracerebrală la iepuri este cea mai severă și este utilizată în special pentru izolarea și întreținerea tulpinilor de virus prin pasaje succesive de la creier la creier.

Blanc (13), Blanc și Caminopetros (15) au fost primii autori care au arătat că iepurele inoculat subdural cu lichidul recoltat din veziculele herpetice umane sau cu produsul obținut din cheratita herpetică experimentală a iepurelui, face la 5 zile de la instituirea inoculului o encefalită mortală transmisibilă în serie.

S-a observat de către Nicolau (139), Le Fèvre de Arric (86) și Blanc și Caminopetros (15) că prin pasaje seriate intracerebrale la iepure, se obține un virus herpetic *fix* care determină la acest animal, inoculat pe aceeași cale, simptome mult mai severe decît prin inoculările cutanate; acest virus administrat pe corneea scarificată provoacă la iepure fenomene

minore de cheratită, urmate de o stare de rezistenţă solidă faţă de inocularea subdurală a virusului.

Iepurele inoculat intracerebral cu virus herpetic *simplex* face fie o encefalită acută, mortală, fie o encefalită de tip cronic, în funcţie cu tulpina de virus folosită şi de receptivitatea animalului (15) (26) (155).

Doerr şi Hallauer (29) şi Plummer şi Hackett (155) au arătat că în urma inoculării intracerebrale unele animale prezintă numai fenomene de mielită, cele encefalitice fiind absente.

După Jambon şi colab. (74) virusul herpetic inoculat intracisternal determină de cele mai multe ori fenomene de meningoencefalită acută, cu sfîrşit letal.

Cloroformizarea sau eterizarea zilnică a animalelor inoculate pe cale intracerebrală le face mult mai sensibile la acţiunea patogenă a virusului, scurtînd mult perioada de incubaţie a bolii (99).

Sub acţiunea cortizonului (0,005 g/kg corp) administrat subcutan se constată o creştere a mortalităţii, numeroase plaje de virus cu rare incluzii fiind prezente în nucleii neuronilor cerebrali (157). După autori, acţiunea agravantă a cortizonului asupra infecţiei herpetice s-ar datora, pe de o parte, unei diminuări a puterii de apărare a organismului, iar pe de altă parte unei modificări a metabolismului celular, care ar favoriza multiplicarea mai intensă a virusului în nucleul celulei.

b. *Inocularea pe cornee.* Virusul herpetic inoculat la iepure pe corneea în prealabil scarificată determină după 2 — 5 zile o cherato-conjunctivită ce evoluează în decurs de o săptămînă către opacifierea totală a corneei şi pierderea vederii. Germenele migrează de-a lungul nervului optic (97) sau de-a lungul nervilor ciliari prin ganglionul Gasser (121) (65) (153) şi ajunge pe calea nervului trigeminal în creier, determinînd o encefalită herpetică, deseori mortală.

Inoculînd virusul pe corneea scarificată de iepure, Nicolitsch (147) constată, din a 1 — 11-a zi de la apariţia cheratitei experimentale, prezenţa leziunilor de encefalită. Faptul că autorul nu izbuteşte să izoleze virusul din creierul acestor animale îl determină să considere în mod eronat că leziunile ar fi determinate de o endotoxină a virusului, ajunsă în creier pe cale nervoasă.

Luger, Lauda şi Silberstein (117) obţin la iepurii inoculaţi pe cale corneeană simptome de infecţie generală, fie de scurtă durată fie de durată mai lungă. Inoculînd sîngele şi emulsia de splină de la iepuri morţi cu infecţie herpetică generalizată, autorii reproduc leziuni corneene specifice virusului.

La iepure, pasajele de la cornee la cornee sînt posibile, animalele prezentînd aceleaşi fenomene de cheratită dendritică urmate de sfîrşit letal în 10 — 15 zile de la inoculare. Condiţia este ca animalul de experienţă să nu fi fost supus unei alte infecţii anterioare cu virus herpetic. Okumoto şi colab. (148), studiind răspunsul corneei de iepure la inocu-

larea repetată cu diverse tulpini de virus herpetic *simplex*, ajung la concluzia că oarecarea rezistență specifică la reinfecția cu virus este determinată nu de anticorpii circulanți ci de rezistența locală a celulelor corneene.

Engle și Stewart (34) studiind patogeneza cheratitei experimentale la iepure, constată că leziunile dendritice apar la 24 ore de la inoculare ele fiind maxime la 5 — 7 zile după care regresează treptat (fig. 56). Vi-

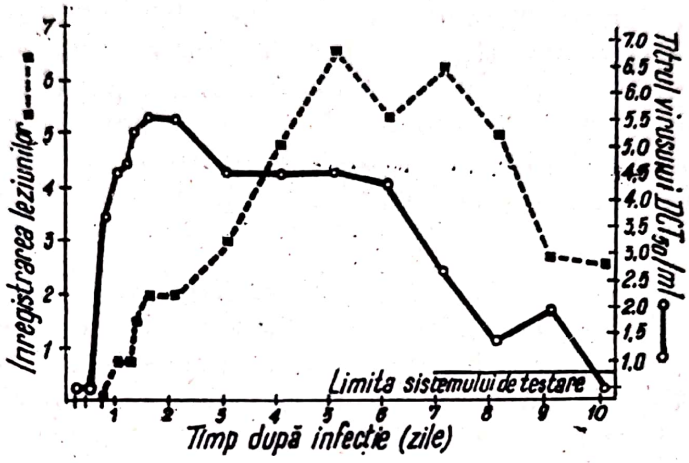


Fig. 56. — Infecție herpetică corneeană la iepure. Multiplicarea virusului și dezvoltarea leziunilor corneene. Engle și Stewart, 1964.

rusul detectat la 18 ore de la infecție are titrul maxim între 1 — 2 zile după care descrește în așa fel încît la 10 zile el este absent.

Sub acțiunea cortizonului, infecția herpetică corneeană la iepure este agravată (157) (75). Titrînd virusul corneean de la animale tratate și netratate cu corticosteroizi, în scopul de a vedea dacă terapia aplicată exacerbează proliferarea virusului, Jawetz și colab., bazați pe rezultatele obținute, conchid că instituirea corticosteroizilor are o acțiune dăunătoare în infecția corneeană, prin interferarea cu procesele reparative normale și cu integritatea structurală a corneei.

Kaufman și Maloney (79) demonstrează de asemenea că aplicarea locală a corticosteroizilor, în cheratita herpetică experimentală la iepuri favorizează proliferarea virusului.

c. *Inocularea conjunctivală.* Inocularea virusului în sau pe conjunctiva oculară (31) după scarificare sau simpla iritație cu oleu de croton (97) poate duce la o nevraxită mortală dacă tulpina de virus utilizată este „puternică".

d. *Inocularea în camera anterioară a ochiului.* Levaditi și Harvier (95), Doerr și Vöchting (31), Morelli (131), Bruni (18), Mariani (124) etc. folosesc, cu rezultate bune, calea de inoculare în camera anterioară a ochiu-

lui, apariţia fenomenelor de nevraxită fiind constantă în special în cazul utilizării unei tulpini ,,puternice'' de virus.

e. *Inocularea în globul ocular şi cristalin.* Ambele căi de inoculare au fost utilizate în infecţia cu virus herpetic. Levaditi, Harvier şi Nicolau (97) obţin prin inoculări în globul ocular aceleaşi fenomene de nevraxită cu sfîrşit letal pe care le obţin şi Goodpasture şi Teague (65) prin introducerea virusului în cristalin.

f. *Inocularea în nerv.* Inocularea virusului într-un trunchi nervos periferic (sciatic) este urmată mai întîi de pareza membrului respectiv, după care se instalează pareza membrului opus, paralizia trenului anterior sau posterior şi uneori sfîrşit letal prin fenomenele de nevraxită.

La iepurii inoculaţi în sciatic sau primul nerv spinal, Boyse şi colab. (17) constată, din punct de vedere clinic, abolirea reflexului de întindere (*splay reflex*).

g. *Inocularea intravenoasă.* Doerr şi Vöchting (31) au fost primii autori care au utilizat calea intravenoasă în infecţia experimentală a iepurelui cu virus herpetic. Introducînd pe această cale secreţia conjunctivală prelevată de la iepurii cu cheratită herpetică experimentală, autorii obţin o infecţie herpetică generalizată şi fenomene clinice de encefalită.

Ulterior, calea de inoculare intravenoasă a fost folosită de mulţi alţi autori ((93) (117) (45) (18) (65) (191) (32) (163) etc.), însă rezultatele obţinute nu au fost constante, chiar atunci cînd s-au utilizat tulpini ,,puternice'' de virus ; o barieră hemato-encefalică intactă se opune în general la implantarea germenului inframicrobian în nevrax. Situaţia este însă cu totul alta dacă înainte de inoculare se traumatizează creierul prin injectarea sub dura-mater a unei soluţii aseptice (soluţie fiziologică, bulion, emulsie de creier normal) (91), a unei suspensii de bacili tuberculoşi sau dacă se produce un şoc traumatic a cutiei craniene sau se administrează intravenos produşi chimici (urotropină, acizi şi săruri biliare, uree, salicilat de sodiu, bromură de potasiu) (88) (89) ; în aceste cazuri virusul se localizează în mod sigur în creier şi determină o encefalită letală.

Un efect de potenţare a virusului introdus pe cale intravenoasă a fost obţinut de Good şi Campbell (61) prin şoc histaminic. Le Fèvre de Arric şi Millet (88) constată că animalele care suferă un şoc traumatic cranian la un sfert de oră de la inocularea intravenoasă a virusului nu prezintă fenomene clinice de infecţie herpetică ; faptul a fost explicat de autori prin aceea că la acest interval de timp virusul nu se mai găseşte în cantitate suficientă în circulaţie pentru a putea declanşa boala prin localizarea sa în nevrax.

La iepurii cu barieră hemato-encefalică nemodificată prin unul din aceste mijloace, Teissier şi colab. (191) obţin numai la jumătate din animalele inoculate intravenos rezultate pozitive, iar prealabila splenectomie sau ovariectomie unilaterală determină apariţia constantă a fenomenelor encefalitice şi encefalomielitice.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările experimentale întreprinse de Koppisch (83), Doerr și Hallauer (29), Hoff și Pötzl (69) au demonstrat că infecția pe cale intravenoasă poate determina fie numai leziuni mielitice, fie leziuni mielitice și encefalitice.

Studiind evoluția infecției pe cale venoasă, Cooke, Hurst și Swan (23) demonstrează că leziunile sînt prezente mai întîi în viscere și apoi în ganglionii spinali, măduvă și în sistemul nervos central.

h. *Inocularea în capsulele suprarenale.* Teissier, Gastinel și Reilly (191) au dovedit că virusul herpetic inoculat în capsulele suprarenale determină apariția unei encefalomielite herpetice mortale cu prezența de leziuni în glanda suprarenală.

Folosind animale imunizate împotriva herpesului, autorii constată că inocularea în glandele suprarenale nu este urmată de boala nervoasă, iar leziunile locale (suprarenale) sînt absente.

i. *Inocularea pe mucoasa nazală.* Prin badijonări cu material virulent, mucoasa nazală sănătoasă opune oarecare rezistență la pătrunderea virusului herpetic în organism; din contra, dacă această mucoasă este lezată printr-un traumatism (scarificare) sau printr-un proces inflamator (ulei de croton) ea devine permeabilă față de virusul introdus prin instilare, badijonare sau cu ajutorul unui tampon îmbibat în emulsia virulentă și lăsat pe loc (95). Levaditi, Hornus și Haber (101) au demonstrat că virusul herpetic introdus în fosele nazale se localizează în mucoasa nazală, determinînd mai întîi leziuni fie ale epiteliului de acoperire, fie în submucoasă,urmate de o diseminare a sa spre nevrax, urmînd calea conexiunilor nervoase ale mucoasei nazofaringiene. Filetele nervoase și lobul olfactiv constituie calea centripetă a virusului pînă în encefal. Este constatat faptul că în procesele inflamatorii cherato-conjunctivale există și o oarecare participare a mucoasei nazale, tradusă printr-o rinită; în cazul de față infecția se propagă în lungul căilor lacrimale ((119) (53) etc.).

În cazul inoculării virusului pe această cale, virulența tulpinei are mare importanță în determinarea bolii, tulpinile „puternic" neurotrope provocînd în mod mai constant decît tulpinile „slabe" fenomene clinice de encefalită, chiar fără traumatismul prealabil al mucoasei (25) (42).

j. *Inocularea în conductul auditiv.* Introducerea repetată a virusului în conductul auditiv extern poate constitui un mod eficace de infectare (113).

k. *Inocularea pe mucoasa genitală.* Virusul herpetic, inoculat prin scarificare pe *mucoasa genitală* a iepurelui, produce pe lîngă leziuni locale mai mult sau mai puțin manifeste o mielită ascendentă urmată de encefalită mortală în 12 — 15 zile (107) (123) (121). La moartea animalului, virusul poate fi găsit în leziunile mucoasei, în nevrax și în filetele nervoase care i-au servit drept cale de acces în măduvă.

Scanned with OKEN Scanner

l. *Inocularea cutanată.* Inocularea virusului pe cale *intradermică* determină la iepure aceleaşi rezultate ca şi după infectarea pe cale cutanată. Inocularea subcutanată a virusului rămîne de obicei fără rezultat şi nici nu determină vreun accident.

Badijonarea cu virus a pielii iepurelui, în prealabil epilată, rasă şi scarificată, determină o erupţie cu carater special (scuamos, papulos sau veziculos) (98) (123) (187) (41).

De la locul de inoculare germenele trece prin filetele nervoase periferice şi ajunge mai întîi în ganglionii spinali corespunzători, apoi în măduvă şi encefal, producînd o encefalită mortală (106).

Force, Steward şi Haff (46) obţin leziuni herpetice cutanate prin inocularea virusului prin scarificare, concomitent cu injectarea subcutană de hialuronidază.

m. *Inocularea digestivă.* Pe cale digestivă, virusul herpetic conferă în general boala tipică cu condiţia ca animalul să ingereze, cu 3/4 oră — 1 oră înainte de inoculare, o anumită cantitate de bilă (162).

n. *Inocularea intramusculară.* Infecţia pe cale intramusculară (muşchi striat) este posibilă cu toate că nu totdeauna determină moartea animalului (77) (191).

o. *Alte căi de inoculare.* Virusul herpetic poate fi inoculat în ficat, pancreas, corp tiroid, ovar şi testicul, determinînd după Teissier, Gastinel şi Reilly (191) în mod constant o boală mortală între a 8-a şi a 20-a zi de la infectarea animalului, cu prezenţa virusului şi a leziunilor în creier şi absenţa lor în organele inoculate.

E de semnalat că în cazul inoculării în ovar, animalul face fenomene de mielită traduse clinic prin paraplegie (65) (191).

Introducerea virusului în glandele salivare (parotidă, submaxilară) este urmată în 2/3 din cazuri de o encefalită mortală, prezenţa virusului şi leziunile specifice lui neputînd fi detectate în organele inoculate.

Levaditi, Harvier şi Nicolau (99 *a*), Teissier, Gastinel şi Reilly (191) reproduc o boală cu simptome de encefalită prin inocularea virusului în trahee.

Iepurele a putut fi infectat, însă în mod inconstant, prin inoculări în rinichi, splină, măduvă osoasă (191), apariţia fenomenelor encefalitice fiind destul de tardivă (9 — 18 zile).

După Levaditi, Harvier şi Nicolau şi Teissier şi colab. căile de infectare intraperitoneală şi intraarterială (carotidă) nu sînt adecvate pentru infectarea iepurelui cu virus herpetic.

Simptomatologia bolii herpetice experimentale la iepure este în raport cu poarta de intrare a virusului în organism.

În urma inoculării virusului în creier, în seria de pasaje cerebrale, incubaţia este mai scurtă. După 3, 4 sau 5 zile de la infecţie, animalul

Scanned with OKEN Scanner

pare neliniștit, prezintă apoi tulburări de echilibru, uneori o salivație intensă, trismus, scrîșnește din dinți și moare după 24 sau 48 de ore de la debutul bolii. Această simptomatologie nu este constantă, în general tulburările morbide apărînd cu puțin timp înainte de moarte. Deseori animalul care pare seara numai agitat este găsit mort a doua zi dimineața.

Tamalet și colab. (186) diferențiază : fenomene majore (crize akinetice, crize tonico-clonice „abortive" și crize tonico-clonice generalizate), tulburări motorii (pareze, mioclonii, mestecare) și semne generale (apatie, somnolență și tulburări de comportament).

Crizele akinetice, precedate uneori de alte tipuri de crize, constau dintr-o oprire în mod brusc a mișcărilor (animalul devine imobil, nu mai reacționează la zgomot, lumină sau înțepătură și dă impresia că și-a oprit cîteva secunde respirația).

Crizele tonico-clonice „abortive" repetate sînt uneori precedate sau, mai frecvent, urmate de crize tonico-clonice generalizate. Ele durează în medie cîteva secunde și constau din hiperextensia capului cu rotație forțată la dreapta sau stînga, urmată de cîteva clonii ale maxilarului inferior.

Crizele tonico-clonice generalizate apar de asemenea în mod brusc. Iepurele devine neliniștit, nu mai reacționează la zgomot, lumină și prezintă hiperextensia lentă a capului în urmă, cu rotație într-o parte sau alta, redoarea rahisului în extensie sau în flexie și hipertonie a trenului anterior. În această fază tonică, care în medie durează de la 30 de secunde pînă la 2 minute, iepurele este în apnee, are contracții ale maxilarelor și scrîșnituri de dinți. Urmează apoi faza clonică de 1 — 2 minute, caracterizată prin clonii ale maxilarului inferior, clonii unilaterale ale mușchilor ridicători ai buzei, ai pleoapelor, și clonii ale trenului anterior (pedalaj, bătut toba) (fig. 57). Deseori aceste clonii se generalizează, fiind însoțite uneori de antepulsiune sau mai frecvent de retropulsiune. Perioada clonică se termină brusc, animalul devenind hiperexcitabil, agresiv, mișcîndu-se și mestecînd într-una.

Inserția virusului pe cornee produce o cherato-conjunctivită caracteristică începînd de la a 3-a zi. Localizarea nervoasă a germenilor introduși pe această cale, pe corneea scarificată, se traduce prin următoarele simptome : după 6—8 zile animalul începe să-și țină capul întors de partea leziunii corneene, poziție pe care și-o menține pînă la sfîrșitul bolii. Apar alte simptome : nistagmus, sialoree, trismus, agitație, mișcări de manej, pareze, paralizii și moartea survine după 10 — 15 zile de la inoculare.

La iepurii cu encefalită herpetică experimentală, Tamalet și colab. (186) constată electroencefalografic modificări ale activității de fond caracterizate printr-o încetinire globală a traseului și o mare frecvență a perioadelor de somn și aspecte tipice crizelor de epilepsie. Bufeele de unde lente de 3,5 c/s și undele rapide de 14 c/s sînt după autor constante în aza acută a bolii, cînd iepurele prezintă stări de rău.

Scanned with OKEN Scanner

În crize și stări de rău activitatea de fond este profund modificată : apar descărcări ritmice bisincrone generalizate ce traduc crizele generalizate tipice care apoi diminuă progresiv trecînd dela 2 c/s la 0,5 c/s și se termină printr-un traseu plat.

Fig. 57. — Encefalită herpetică la iepurele inoculat intracerebral cu virus herpetic. Animalul ridicat pe labele posterioare are atitudinea „bătutului tobei". Portocală, 1941.

Cajal și colab. (20) descriu modificări electrocardiografice pe care le consideră de natură centrală, datorită faptului că virusul nu a putut fi izolat din miocard, iar modificările morfopatologice sînt foarte discrete.

Inocularea pe *piele* sau pe *prepuț* produce de obicei paralizii care durează cîteva zile și sînt în legătură cu leziunile produse de virus în măduvă. În acest caz moartea apare după 14 — 20 de zile de la inoculare.

Indiferent de calea de introducere a virusului în organismul animal, boala experimentală este însoțită de febră și modificări citologice ale sîngelui (fig. 58). Uneori creșterea febrei la iepurele infectat intracerebral este însoțită de o scădere în greutate (100 — 200 g), inapetență și diaree (186).

De obicei febra se ridică pînă la 41° și se menține în jurul acestei limite, pentru ca apoi, în perioada ce precede moartea, ea să scadă sub normal. Hipotermia preagonică este regulă în boala experimentală a iepurelui. Modificările citologice ale sîngelui se traduc printr-o hiperleuco-

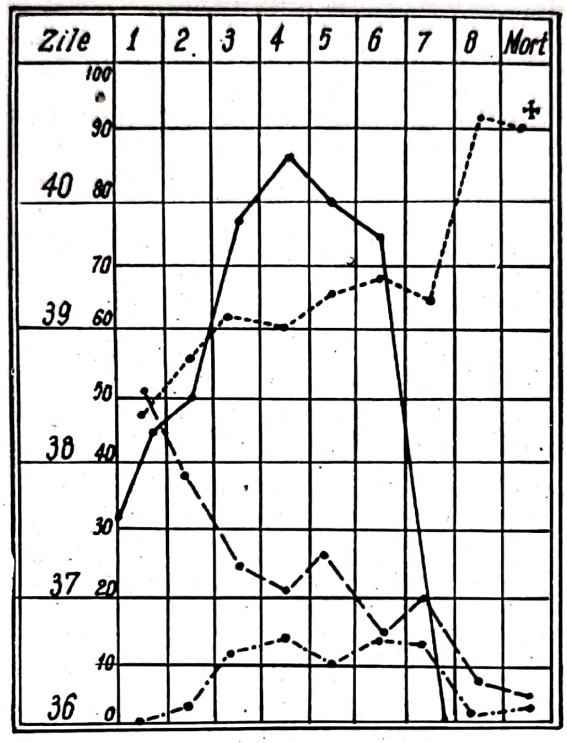


Fig. 58. — Iepure inoculat intracerebral cu virus herpetic. Se observă evoluția curbei febrile și procentajul leucocitelor din sîngele prelevat din vena marginală a urechii.

——— ——— = curba febrilă;
. . . . . = polinucleare pseudo-eozinofile;
— — — — — — = limfocite;
— · — · — · — · = mononucleare mari.

Levaditi, Harvier și Nicolau, 1922.

citoză cu polinucleoză. Această reacție este însoțită de o limfocitopenie urmată de o monocitoză (87).

Numărul hematiilor nu este influențat, însă rezistența globulară este diminuată (de la 0,36% NaCl în prima zi de boală, ea trece la 0,42% NaCl în a 5-a zi).

Albuminuria este constantă, iar cilindruria frecventă.

Fridman şi Samuel (47) studiază în dinamică modificările concentraţiei fracţiunilor proteice din serul iepurilor inoculaţi cu virus herpetic *simplex* (tulpina Bruxelles) pe corneea scarificată şi la cei inoculaţi pe cale cerebrală, comparativ cu concentraţia acestor fracţiuni în serul animalelor martore, inoculate intracerebral cu suspensie de creier normal de iepure.

La primul lot de animale s-a constatat o scădere a raportului A/G, cu o creştere a beta-globulinelor, creştere ce progresează cu evoluţia infecţiei, în aşa fel încît în 8 zile de la inoculare se ridică la peste 100% faţă de concentraţia existentă în serul cercetat anterior infecţiei. Scăderea albuminelor de la 57% înainte de inoculare, la 41% la 8 zile de la inoculare, cu rămînerea aproape constantă a alfa-globulinelor şi gama-globulinelor arată că această creştere a beta-globulinelor se realizează în special în dauna albuminelor.

Aceleaşi rezultate de creştere a beta-globulinelor au fost observate şi la lotul de animale supuse infecţiei cerebrale, cu singura deosebire că această creştere este mai puţin marcată, concentraţia maximă (24%) fiind prezentă în serul recoltat la 4 zile de la inoculare. După autori, scăderea albuminelor numai la 6,3% arată că beta-globulinele cresc de data aceasta mai ales în dauna gama-globulinelor care la 2 zile de la inoculare scad cu 29% faţă de concentraţia existentă înainte de inoculare. Concentraţia gama-globulinelor se menţine însă scăzută pînă la moartea animalelor.

Diagramele electroforetice ale martorilor au prezentat procente constante ale fracţiunilor proteice, cu mici variaţii între limitele normale.

Creşterea beta-globulinelor şi scăderea gama-globulinelor a fost explicată de autori prin aceea că imunizarea organismului animalului nu are timp să se producă datorită incubaţiei scurte a infecţiei şi evoluţiei rapid letale la majoritatea animalelor.

Cajal şi Lissievici (21) şi Portocală şi colab. (159) (161) constată la iepurii infectaţi cerebral sau corneean cu virus herpetic *simplex* o creştere a glicemiei şi conchid asupra faptului că această perturbare este datorită localizării virusului în centrul glicoregulator.

2. ŞOARECELE

Numeroşi autori au demonstrat că şoarecele sugar şi adult este sensibil faţă de virusul herpetic introdus pe diverse căi. Menţinuţi după inoculare la o temperatură ambiantă de 37°C, ei devin mai rezistenţi la infecţia cu virus herpetic decît martorii inoculaţi cu aceeaşi cantitate de virus şi meţinuţi la 26°C sau 2°C (175).

De asemenea, şoarecele devine mult mai sensibil faţă de virusul herpetic dacă i se administrează glucoză intraperitoneal (70) sau sînt supuşi acţiunii unor dispozitive electrice sau mecanice (162).

Scanned with OKEN Scanner

a. *Inocularea intracerebrală.* Levaditi, Harvier şi Nicolau(96),Blanc şi Caminopetros (16), Doerr şi Schnabel (30), Andervont (1) (2), Fischl şi Schaefer (39), Schaefer (174), Gildemeister şi Ahlfeld (56) (57), Burnet şi Lusch (19) etc. au arătat că şoarecele adult infectat pe cale intracerebrală cu virus herpetic face deseori fenomene de nevraxită herpetică caracteristică. La 2 — 3 zile de la inoculare animalul este agitat şi prezintă un simptom caracteristic, denumit de Levaditi, Harvier şi Nicolau (96) „*souris dansantes*", după care sfîrşeşte letal.

După Staigman şi Scott (181), inocularea virusului pe cale intracerebrală este urmată la 3 — 10 zile de o encefalită letală, transmisibilă în serie.

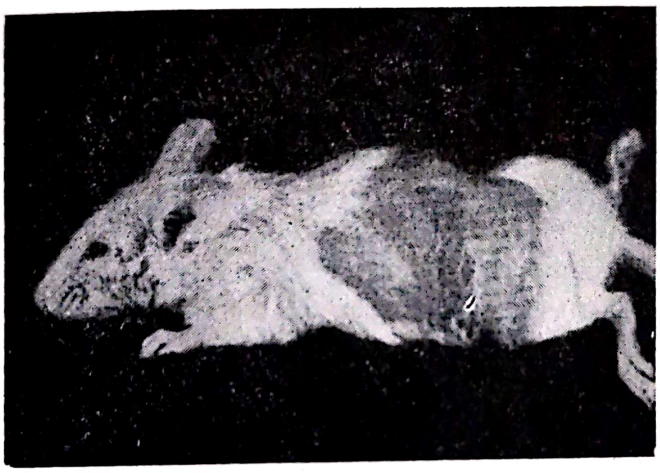


Fig.59. — Şoarece în vîrstă de 4 săptămîni cu leziuni cutanate herpetice apărute la 6 zile de la inocularea virusului pe această cale. Sydiskis şi Schultz, 1965.

b. *Inocularea pe alte căi.* Folosind calea de inoculare intraperitoneală, intrasciatică, intravenoasă, subcutană, intradermică, intranazală, intraoculară, corneeană sau plantară, Levaditi, Nicolau şi Harvier (110) Luger şi Erdenstein (116), Andervont (1) (2), Gildemeister şi Ahlfeld(56) (57), Burnet şi Lush (19), Findlay şi Mac Callum (38), Staigman şi Scott (181) etc. obţin rezultate mai mult sau mai puţin concordante, în funcţie probabil de tulpina de virus utilizată.

S-a arătat de altfel de către King (81) că tulpina HF de virus herpetic *simplex* este mult mai patogenă pentru şoarece prin inocularea pe cale intraperitoneală şi subcutană decît pe cale intranazală. Gildemeister şi Ahlfeld (56), Berry şi Slavin (6) şi Slavin şi Berry (177) (178), inoculînd virusul herpetic pe cale cutanată sau nazală, obţin în mod constant fenomene de encefalită.

Sydiskis şi Schultz (184) obţin prin inocularea subcutană leziuni locale (fig. 59) a căror frecvenţă descreşte însă cu vîrsta animalului. Şoarecii în vîrstă de 5 săptămîni fac la 5 — 6 zile de la inocularea virusului

pe această cale o boală diseminată (sanguină şi nervoasă), curba de creştere a virusului fiind identică cu cea din culturi tisulare. La 27 de ore de la inocularea virusul începe să se multiplice (fig. 60), ajungînd la 5 zile la $10^{7,3}DIC_{50}/g$ de piele, pentru ca la 9 — 10 zile să scadă foarte mult ($10^{2,5}DIC_{50}/g$ piele).

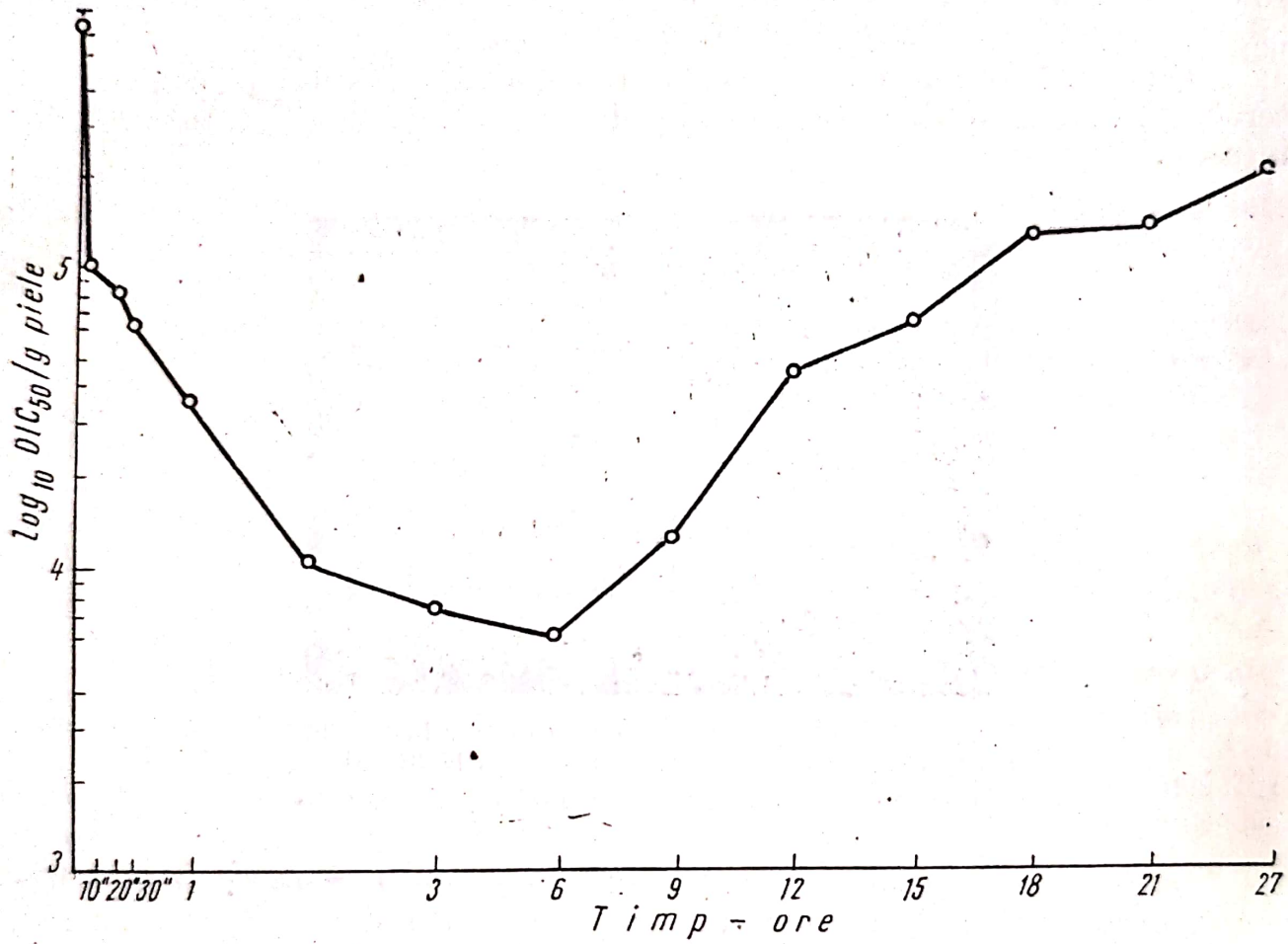


Fig. 60. — Curba de creştere a virusului herpetic *simplex* în pielea şoarecelui după inocularea subcutană a $10^{5,6}$ DIC_{50}. Sydiksis şi Schultz, 1965.

King (81) demonstrează de asemenea că introducerea virusului în vitros este urmată de fenomene encefalitice, virusul mergînd de la locul inoculării pe calea trigemenului pînă în ganglionul Gasser şi nucleul trigemenului (perechea V), determinînd apoi fenomene de encefalită.

Doerr şi Hallauer (29) constată că virusul herpetic inoculat pe cale intravenoasă determină simptome clinice de mielită.

Portocală (158), inoculînd virusul intracaudal la şoarecele adult, obţine o boală experimentală caracterizată prin paralizia trenului posterior, urmată de o tetraplegie ascendentă cu moarte între a 11-a şi a 17-a zi de la infectare.

Scanned with OKEN Scanner

Syverton, Garabedian și Friedman (185) aduc date în ceea ce privește efectul razelor X, cortizonului și mucinei, singure sau în asociație, asupra infectivității virusului herpetic *simplex*. Inoculînd intraperitoneal șoareci albi cu amestec virus-mucină, autorii constată o mortalitate crescută, în special la loturile de animale cărora li s-a administrat cortizon sau au fost iradiate; efectul ramforsant al mucinei asupra virusului este mult scăzut dacă animalelor li se instituie un tratament combinat, iradiație + cortizon. La lotul de animale inoculat cu virus herpetic fără adaos de mucină, iradierea are un slab efect asupra mortalității, în timp ce prin administrarea cortizonului sau a cortizonului + iradiație, indicele mortalității crește.

Aceste rezultate i-au determinat pe autori să conchidă că infecția șoarecelui alb cu virus herpetic *simplex* este influențată de diverși agenți care modifică rezistența organismului gazdă; asocierea mucinei și a cortizonului ar acționa ca inhibant al reacției celulare și/sau ar diminua distrugerea virusului de către fagocite.

Șoarecele tînăr. Lennette și Koprowski (85), studiind susceptibilitatea șoarecilor de diferite vîrste față de infecția cu virus herpetic, constată că șoarecii tineri sînt cei mai sensibili față de virusul inoculat extraneural, titrurile cele mai mari de virus fiind decelate în creierul lor.

Berry și Slavin (6), infectînd pe cale intranazală șoarecii de 2 săptămîni, obțin o encefalită herpetică. Autorii pun în evidență prezența virusului în plămîni, creier, ficat, splină, capsule suprarenale și măduva spinării. Cu ocazia acestui studiu autorii conchid că pătrunderea virusului în creier se face pe cale trigeminală și olfactivă, invadarea de către virus a ficatului, splinei, capsulelor suprarenale și măduvei făcîndu-se pe cale hematogenă.

Evans, Slavin și Berry (35) (36) constată că șoarecii de 2 săptămîni, inoculați cu virus herpetic pe cale intracutană și prin scarificare plantară, fac fenomene de encefalită. Ei au demonstrat totodată că majoritatea animalelor cărora li s-a făcut amputarea membrului la 2 ore de la administrarea intraplantară a virusului nu mai prezintă fenomene de encefalită herpetică, propagarea virusului pe calea nervilor, de la locul de inoculare spre sistemul nervos, fiind suprimată. Acest fenomen nu a fost însă observat de Evans și colab. la lotul de animale cărora li s-a făcut amputația la 24 de ore de la inocularea virusului intraplantar. Totuși unele animale au prezentat fenomene de encefalită chiar cînd amputarea s-a făcut la 2 ore de la inoculare. Explicația dată de autori a fost aceea că virusul a ajuns în creier pe cale metastatică, punctul de plecare fiind viscerele.

Șoarecele sugar este foarte sensibil la inocularea virusului pe cale intracerebrală sau intraperitoneală, fenomenele clinice apărînd la 4 — 5 zile după instituirea infecției.

Scanned with OKEN Scanner

Kilbourne şi Horsfall (80), Lennette şi van Allen (84) obţin prin inocularea intracerebrală sau intraperitoneală a şoarecilor sugari în vîrstă de 1 — 3 zile o boală caracterizată prin hiperexcitabilitate, subnutriţie, cianoză, distensie abdominală, tulburări de coordonare şi paralizii, urmate de moarte în 5 — 6 zile de la infectare.

După inocularea intracerebrală a şoarecilor sugari, în vîrstă de 4 — 5 zile cu 100 LD_{50} de virus (HFEM), Johnson (77) constată apariţia fenomenelor de encefalită cu sfîrşit letal rapid la 3 zile de la inoculare.

Cu o tulpină de virus herpetic proaspăt izolată, Beswick (7) (8) reproduce la şoarecele sugar infectat intraperitoneal o mielită ascendentă cu paralizia trenului posterior. Aceeaşi tulpină de virus trecută în pasaje succesive pe corneea de iepure, şoarecele tînăr sau pe membrana coriolalantoidă a oului embrionat de găină, îşi pierde capacitatea sa neurotropă pentru şoarecele sugar inoculat intraperitoneal, leziunile fiind decelate numai în organele peritoneale. S-a constatat însă de către Beswick că această tulpină de virus care a fost trecută de repetate ori pe organismele amintite îşi menţine proprietatea de a se multiplica în ţesutul nervos, inocularea intracerebrală sau subcutană determinînd leziuni în creier şi respectiv în măduva spinării.

După autor, apariţia leziunilor numai în organele peritoneale la şoarecele sugar inoculat intraperioneal cu virusul modificat prin pasaje succesive se datoreşte procesului inflamator local care împiedică propagarea virusului spre sistemul nervos central.

3. COBAIUL

Cobaiul este mai puţin sensibil decît iepurele faţă de activitatea patogenă a virusului herpetic.

a. *Inocularea intracerebrală.* Levaditi şi Harvier (93), Doerr şi Schnabel (30), Blanc şi Caminopetros (16) etc. provoacă prin inoculare cerebrală o encefalomielită care nu este totdeauna mortală. Incubaţia bolii este mai lungă decît la iepure (7 — 15 zile), iar simptomatologia mai frustă.

După Zarafonetis şi colab. (202) inocularea virusului intracerebral este urmată de o boală febrilă şi ocazional de convulsii. Urbain, Goursartchik şi Schaefer (196) au arătat însă că inocularea virusului pe cale cerebrală determină fenomene clinice de boală numai în 70% din animale. Boala clinic manifestă apare la 3 — 8 zile de la inoculare.

Deşi cobaiul prezintă o rezistenţă parţială faţă de infecţia herpetică, tulpinele înzestrate cu o virulenţă mai mare pot fi trecute în serie de la creier la creier, pe această specie animală (40).

Dimitrieff (28), Rose şi Walthard (173) arată însă că după treceri repetate pe creier de cobai, virusul îşi pierde din puterea sa patogenă pentru iepure.

Scanned with OKEN Scanner

S-a constatat însă că tulpinile slabe de virus inoculate intracerebral la cobai nu determină fenomene clinice de boală (149).

Animalele cărora li s-au făcut duble inoculări (cerebrală și corneeană) fac însă boala experimentală.

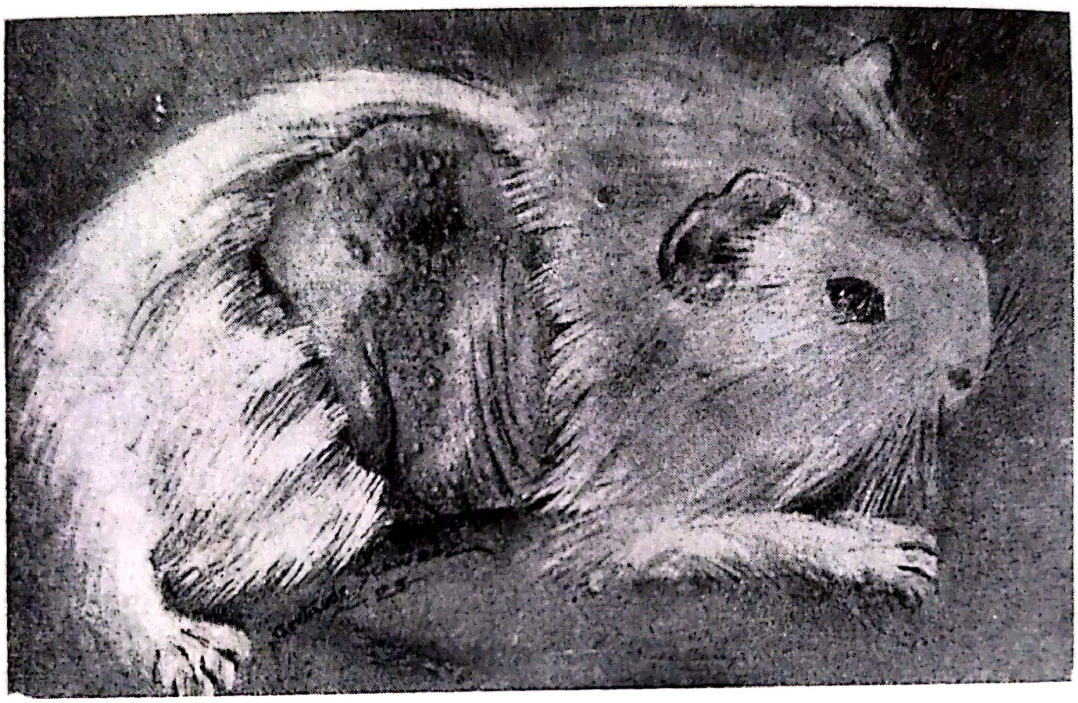


Fig. 61. — Cobai infectat experimental cu virus herpetic. Se observă erupția herpetică cutanată; zona ulcerată reprezintă locul de inoculare a virusului. Teague și Goospasture, 1923.

b. *Inocularea pe cornee.* Doerr și Vöchting (31), Luger și Lauda (118), Blanc și Caminopetros (14), Löwenstein (115) au demonstrat că *infecția pe cale corneeană* este posibilă. Cherato-conjunctivita consecutivă nu diferă de cea a iepurelui, însă este rareori urmată de o encefalomielită mortală.

Urbain și colab. (196), din cele 12 tentative de infecție pe cale corneeană, nu au obținut decît 1 rezultat pozitiv.

În experiențele lor, Gastinel și Reilly (51) au arătat că, deși cobaii infectați pe această cale nu prezintă fenomene clinice de encefalită, virusul este totuși prezent în creier.

c. *Inocularea virusului pe pielea rasă și scarificată a flancului* poate determina a doua zi leziuni veziculare (fig. 61) mai mult sau mai puțin intense, urmate la 4 — 8 zile de o mieloencefalită care descori duce la moarte (187) (4) (194) (198).

La cobai, calea electivă de inoculare a virusului herpetic pare a fi cea în metatars.

d. *Inocularea virusului în pielea metatarsului* produce o leziune veziculo-pustuloasă caracteristică (58) (172) (5) (143).

În 3 — 6 zile de la inoculare, Urbain şi colab. (196) obţin la 98% din animale apariţia de vezicule, care în 1,2,3 zile după aceea sînt urmate de generalizarea nevraxică. Virusul se propagă pe cale nervoasă pînă la măduvă şi determină nevraxita. Moartea apare la 10 — 17 zile şi este precedată de fenomene paralitice (paraplegie însoţită de incontinenţă de urină şi materii fecale) care durează cîteva zile.

Platt (154) obţine prin inocularea virusului în metatars leziuni herpetice locale, însă fără diseminarea sa de la locul leziunii.

e. *Alte căi de inoculare.* Cobaiul poate fi însă infectat şi prin instilare intranazală cu cîteva picături din emulsia virulentă (127), sau prin inocularea unei cantităţi mari de virus pe cale intravenoasă, intraperitoneală, subcutană şi digestivă (198).

La cobaii morţi de nevraxită herpetică experimentală, virusul nu este prezent decît în sistemul nervos. Totuşi, puţine tulpini foarte virulente, înzestrate în acelaşi timp cu un anumit pantropism, fac excepţie de la această regulă, virusul putînd fi regăsit — în afară de nevrax — în sînge şi în diferite organe (11).

4. MAIMUŢA

a. *Inocularea intracerebrală.* Levaditi, Harvier şi Nicolau (95) au demonstrat că prin inocularea suspensiei de creier de iepure mort de encefalită herpetică pe cale intracerebrală la maimuţe inferioare, numai maimuţa *Macacus cynomolgus* face fenomene de nevraxită cu sfîrşit letal în a 12-a zi de la infectare.

Mai tîrziu, Levaditi şi Nicolau (109), utilizînd aceeaşi cale de inoculare la 8 maimuţe inferioare, obţin rezultate pozitive numai la un *Cercocebus fuliginosus* şi la doi *Macacus cynomolgus.*

Levaditi şi Schoen (112) cercetează sensibilitatea mai multor specii de maimuţe (*Cercopithecus potas*, *Macacus sinicus*, *Papi sphinx*, *Cynocephalus ramadras şi Cynocephalus babuin*) faţă de virusul herpetic inoculat cerebral şi constată că numai specia *Macacus sinicus* face fenomene de nevraxită.

De asemenea, Levaditi şi Lépine (103), prin inoculări repetate de virus la *Cercopithecus callitrix*, constată fenomene de boală numai la o parte din animale.

Zinsser (203) şi apoi McKinley şi Douglas (128) obţin aceleaşi rezultate prin inocularea intracerebrală la *Cebus olivacens*, fenomenele clinice encefalitice avînd aspect cronic, identic bolii umane.

Delorme (27), inoculînd virusul la *cimpanzeu* sub dura-mater, obţine o encefalită mortală, deşi la aceeaşi specie inoculările intracerebrale făcute de către Levaditi şi Nicolau (109) au dat rezultate negative.

Scanned with OKEN Scanner

Toate aceste date arată deci că maimuța inoculată intracerebral face boala inconstant, ca și cînd sistemul său nervos ar avea un oarecare grad de imunitate naturală.

b. *Inocularea pe cornee.* Cu toate că inocularea virusului pe corneea scarificată la *Macacus cynomolgus* a dus la rezultate negative (14) inocularea pe aceeași cale la *cimpanzeu*, a unei tulpini de virus puternic dermotrope, a fost urmată de o cherato-conjunctivită tipică virusului, fără fenomene nevraxice (111).

Teissier, Gastinel și Reilly (192) constată însă că inocularea pe cornee la maimuța *callitrix* nu determină niciun simptom de boală.

c. *Inocularea pe piele.* Teissier, Gastinel și Reilly (192), inoculînd virusul pe piele la maimuța *callitrix*, obțin leziuni papulo-crustoase, bogate în virus, care nu sînt însă urmate de apariția fenomenelor encefalitice. Prin caracterul său eruptiv leziunea este comparabilă cu cea observată la om. După autorii sus-menționați, maimuțele *Macacus rhesus*, *cynomolgus* și *sinicus* par a fi rezistente la infecția pe această cale.

S-a demonstrat însă că virusul luat din leziunea tegumentară a maimuței și inoculat pe cornee la iepure determină apariția de leziuni corneene, specifice virusului, urmate de fenomene encefalitice; virusul își păstrează deci neurotropismul său.

5. ȘOBOLANUL ALB

Inoculat pe cornee cu lichidul vezicular recoltat din leziunea de herpes labial sau cu emulsie cerebrală de iepure cu encefalită herpetică, șobolanul alb reacționează printr-o cheratită ușoară urmată uneori de o nevraxită mortală (188).

Cu virusul herpetic de pasaj, autorii observă că uneori, deși leziunea corneeană este absentă, animalul face fenomene encefalitice. În aceste cazuri virusul invadează rapid sistemul nervos pe cale nervoasă fără ca afinitatea sa ectodermotropă să se manifeste. Acest fenomen este identic cu cel observat de Levaditi și Nicolau (108) în experiențele lor pe iepure prin inocularea pe corneea scarificată a virusului herpetic menținut la glicerină.

S-a arătat de către Peiser (152), Flexner și Amoss (42) Smith, Lennette si Reames (179), Wenner (200) că virusul introdus în creier omoară deseori șobolanul alb.

După Cowdry, Lucas și Neff (24) carența în vitaminele B_1 și B_2 pare să mărească receptivitatea șobolanului alb față de virusul introdus în creier.

În experiențele sale, Gaviati (54) demonstrează că inocularea virusului pe pielea scarificată la acest animal, nu produce întotdeauna leziuni.

Doerr și Hallauer (29), în încercările lor, reușesc să reproducă la șobolani o mielită prin inoculări intravenoase de virus herpetic.

Scanned with OKEN Scanner

6. HAMSTERUL AURIU (CRICETUS [AURATUS)

Wenner (200) şi Zarafonetis şi colab. (202) au demonstrat că hamsterul este sensibil la inocularea intracerebrală a virusului herpetic.

Cercetări întreprinse de Cepleanu şi Cajal (22) au arătat că acest animal este sensibil la infecţia intracerebrală şi intranazală cu virus herpetic.

După o perioadă de incubaţie de 3 zile hamsterul inoculat intracerebral face fenomene de meningo-encefalită (apatie, tulburări de echilibru, sialoree, trismus, scrîşnirea dinţilor, pareze şi paralizii) cu sfîrşit letal.

Inocularea intranazală a virusului herpetic determină după o perioadă de incubaţie de 5 zile fenomene clinice de boală caracterizate prin dispnee, sialoree, cianoză şi semne de encefalită.

Inocularea intraperitoneală, subcutană sau intramusculară nu este urmată de fenomene clinice de boală.

7. PISICA

Doerr şi Schnabel (30), în încercările lor de a obţine fenomene clinice de boală, prin inoculări intracerebrale la pisică, constată că această specie animală este refractară faţă de virusul herpetic.

Remlinger şi Bailly (164) (166), folosind o tulpină marocană de virus herpetic, reproduc la pisică o boală herpetică tipică prin inoculări intracerebrale. Ulterior, Urbain şi Schaefer (198) obţin aceleaşi rezultate.

Toate aceste rezultate experimentale arată că această specie animală reacţionează în mod inconstant la inocularea intracerebrală a virusului herpetic.

8. CÎINELE

În cercetările lor, Blanc şi Caminopetros (14) nu obţin fenomene clinice de boală la cîinele infectat experimental.

Remlinger şi Bailly (167) şi Urbain şi Schaefer (198) demonstrează însă susceptibilitatea cîinelui faţă de virusul herpetic inoculat intracerebral.

Primii din aceşti autori, folosind tulpina de virus herpetic marocan adaptată la creierul de pisică, obţin la 4 — 5 zile de la inoculare fenomene tipice de encefalită, cu evoluţie letală în 8 — 9 zile. Aceşti autori constată însă că prin pasaje efectuate la pisică virusul capătă o agresivitate specială pentru cîine; acelaşi virus trecut la iepure nu determină nici un fenomen de boală caracteristică infecţiei herpetice.

Scanned with OKEN Scanner

9. MARMOTA (ARCTOMYS MARMOTTA)

Pare să fie tot atît de sensibilă ca și iepurele față de virusul herpetic (170).

10. PORUMBELUL, GÎSCA, ARICIUL ȘI VULPEA

Reacționează inconstant la inocularea intracerebrală a virusului herpetic (169) (171) (104).

11. ALTE SPECII ANIMALE

Calul, măgarul, oaia, capra, găina, rața, vrabia, broasca țestoasă, terestră sau de apă dulce și „Cyprin d'oré" s-au dovedit în experiențele lui Remlinger și Bailly (168), a fi refractare față de virusul herpetic, puternic neurotrop, inoculat pe cale intracerebrală. De asemenea McKinley (126), inoculînd repetat virusul subcutan la cal și oaie, obține o imunizare a lor, serurile rezultate neavînd însă capacitate de neutralizare *in vitro*. Un fapt constatat de Remlinger și Bailly a fost acela că la broasca țestoasă virusul herpetic inoculat intracerebral nu este distrus imediat, ci persistă în creier timp de 72 de ore, el putînd fi recuperat în această perioadă prin inocularea intracerebrală la iepure a suspensiilor de creier de broască.

B. REPARTIȚIA VIRUSULUI ÎN ȚESUTURI ȘI UMORI

În urma nevraxitei herpetice mortale a animalelor inoculate pe una din căile sus-menționate, virusul poate fi regăsit în tot sistemul nervos central, în ganglionii spinali, în ganglionii Gasser și deseori în nervii periferici (septinevrita lui Nicolau).

În cursul bolii experimentale, virusul poate fi găsit uneori în lichidul cefalorahidian (122) (43) (197) (60). Virulența acestui lichid, în timpul diferitelor faze ale bolii și după moartea animalelor, a fost studiată de Nicolau și Kopciowska (142). Ei au arătat că lichidul cefalorahidian virulent prin introducerea emulsiei de germeni intracerebral are tendința de a se steriliza cu toate că procesul infecțios este în progresie la nivelul nevraxului. El este virulent primele 3 zile care urmează inoculării, apoi devine slab virulent sau chiar pierde total puterea sa infectantă în ziua a 4-a și a 5-a.

După moartea animalului, lichidul prelevat conține aproape întotdeauna virus în abundență. Citologia lichidului cefalorahidian explică aceste rezultate : polinuclearele, numeroase în prima fază, sînt înlocuite de limfocite și monocite în faza tardivă ; la aceste elemente se adaugă

post-mortem celulele provenite din dezintegrarea meningelor inflamate. Aceste ultime elemente restituie lichidului activitatea sa patogenă în mare parte pierdută.

Inoculat intracerebral la animal, virusul herpetic poate fi găsit numai în mod excepţional în organe, măduvă osoasă, ganglioni limfatici, muşchi striaţi şi materii fecale (197) (198). În nevrax, ganglionii spinali, ganglioni Gasser, ganglionii simpatici (105) şi în nervii periferici (140) (141) (82) virusul este prezent în mod constant. În sînge şi urină el este însă destul de frecvent întîlnit.

VIREMIA

Doerr şi Vöchting (31) au fost primii autori care au vorbit de difuzarea hematogenă a virusului herpetic inoculat pe corneea scarificată a iepurelui.

Ulterior Field (37) atribuie viremiei un rol important în producerea leziunilor sistemului nervos central.

Gildemeister şi Heuer (59) demonstrează prezenţa în sînge a virusului herpetic introdus intratesticular sau pe cale cutanată la iepure.

Greenbaum şi Harkins (66), inoculînd iepuri pe corneea scarificată cu sînge prelevat de la aceeaşi specie animală infectată cu virus herpetic, obţin cherato-conjunctivita specifică acestui virus. Remlinger şi Bailly (165), folosind aceeaşi metodă de infectare reproduc la iepure encefalita herpetică.

Nikolitsch (147), studiind cheratita herpetică experimentală la iepure, vorbeşte de apariţia leziunii corneene la ochiul opus.

Biegeleisen, Riley şi Scott (9) infectează iepuri pe cale corneeană cu virus herpetic (0,1 ml din suspensia vitelină ce conţinea cel puţin 10^4 LD_{50} virus în 0,5 ml), pe care-i sîngerează apoi la diverse intervale de timp (24, 48, 54, 60, 66, 72, 76, 84, 90, 96, 102, 108, 120 şi 132 de ore) de la infectare şi decelează, cu excepţia probelor recoltate la 76 şi 102 ore, prezenţa virusului în sînge în toată această perioadă de timp (pînă la 132 de ore). Nu s-a putut însă demonstra durata acestei viremii, prelevările de sînge făcîndu-le numai pînă la 132 de ore, cînd virusul este încă prezent în sînge.

La animalele moarte de boala experimentală, prezenţa virusului a putut fi de asemenea pusă în evidenţă în sistemul nervos, splină, cord, ficat, rinichi şi pulmon.

Virusul herpetic a mai fost izolat de Berry şi Slavin (6) din sîngele şoarecilor infectaţi experimental; nu s-a izbutit însă izolarea virusului de la embrionii acestor animale. Levaditi, Harvier şi Nicolau (99 *a*) au demonstrat la iepuroaică, că germenul herpetic traversează filtrul placentar şi se localizează în nevraxul fetusului.

Biegeleisen şi Scott (10), cercetînd posibilitatea unei infecţii transplacentare la iepuroaicele gravide după inocularea pe corneea

scarificată, izolează virusul pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat de la toți fetușii prelevați. Aceste rezultate determină pe autori să considere că infecția fetușilor a fost determinată de trecerea virusului prin bariera placentară. Recent, Mitchell și McCall (130) aduc date ce demonstrează transmiterea transplacentară a virusului.

Biegeleisen și Scott pun în discuție și ipoteza dacă un număr de malformații congenitale la om nu ar fi determinate și de virusul herpetic care este destul de frecvent izolat din sîngele nou-născuților.

Harrison și colab. (67), cercetînd, efectele teratogene produse la embrionii de găină de către unele virusuri, constată că 3 virusuri (herpetic, vaccinal și gripal de tip A) din cele 4 studiate determină microcefalie și flexie axială a embrionilor, fără diferențe prea mari pentru fiecare din acești germeni.

Geller, Coleman și Jawetz (55), inoculînd intravenos virus herpetic la 11 voluntari canceroși între 27 și 71 de ani, urmăresc apariția și persistența sa în sînge la diverse intervale de timp de la infecție, atît în probele recoltate pe heparină cît și pe citrat de sodiu. Probele recoltate pe heparină au fost menținute 30 — 60 min la temperatura camerei, iar cele recoltate pe citrat au fost introduse în baie cu gheață pentru a îndepărta acțiunea neutralizantă a factorilor nespecifici existenți în plasmă. Plasma și eritrocitele obținute după centrifugarea probelor de sînge astfel recoltate au fost inoculate pe oul de găină embrionat pe cale intravitelină și pe membrana corioalantoidă.

Rezultatele acestor tentative de izolare au arătat autorilor că virusul, deși a fost inoculat în cantitate mare în sîngele circulant al acestor indivizi, nu poate fi găsit într-o cantitate semnificativă, numărul embrionilor morți în urma inoculării intraviteline fiind foarte mic, iar leziunile membranei corioalantoide, tipice infecției herpetice, reduse ca număr. Aceasta denotă că mai mult de 90% din virusul inoculat intravenos a fost imediat neutralizat de către anticorpii existenți în sîngele circulant.

Autorii își pun însă și întrebarea dacă aceiași factori inhibitori nespecifici, care au un rol demonstrat în infecțiile cu virus gripal, New-Castle, encefalita ecvină de vest, oreillon, variolă, nu ar avea acțiune și asupra virusului herpetic.

Experiențele similare făcute însă *in vitro* au arătat autorilor că inocularea amestecului de virus cu plasmă (plasmă încălzită 30 min la 56° sau cu plasmă neîncălzită) determină leziuni intense pe membrana corioalantoidă sau moartea embrionilor la loturile de ouă inoculate intravitelin.

a, *Rolul eritrocitelor în infecția herpetică.* Subladze și colab. (182) au arătat că atît eritrocitele embrionilor de găină și șoarecilor infectați cu virus, cît și cele ale persoanelor cu boală herpetică au virusul prezent în stroma lor, fie sub formă de corpusculi elementari solitari fie aglutinați sub formă de incluzii. Autorii au dovedit în cercetările lor că infectivitatea sîngelui este proporțională cu numărul particulelor virotice din

eritrocite. În toate tulpinile de virus studiate, particulele virotice sînt prezente în eritrocite, însă intensitatea infecţiei eritrocitelor diferă de la o tulpină la alta.

b. *Rolul leucocitelor în infecţia herpetică.* S-a constatat (73) că leucocitele de iepure normal sau de iepure imunizat antiherpetic măresc efectul neutralizant al serului antiherpetic care s-a arătat incapabil de a neutraliza o anumită cantitate de virus.

Garabedian şi Syverton (49), inoculînd şoareci tineri cu amestec virus + ser normal de iepure la care s-au adăugat leucocite de la animalele imunizate antiherpetic, obţin o neutralizare a virusului. Rezultatele negative de seroneutralizare cu serul normal de iepure + leucocite de la animalul normal i-a îndreptăţit pe autori să considere că leucocitele ar juca un rol în diseminarea şi/sau distrugerea virusului.

Nahmias, Kibrick şi Rosan (136), utilizînd culturi celulare de leucocite preparate după tehnica lui Moorhead şi colab. (132), constată în primele 3 — 4 zile de la infectarea lor cu virus herpetic o scădere a titrului virusului urmată apoi de o creştere a sa, ce se menţine pînă în ziua a 26-a de la inoculare.

Autorii observă că replicarea virusului nu are loc decît în prezenţa fitohemaglutininei, fapt care sugerează că leucocitul poate fi susceptibil infecţiei cu virus herpetic, însă numai într-o anumită fază de diferenţiere a sa.

C. CĂILE DE ELIMINARE A VIRUSULUI DIN ORGANISM

Eliminarea virusului din organismul iepurelui infectat experimental se poate face prin mucoasa nazală, prin salivă, lacrimi, şi mai rar prin urină şi materii fecale.

În ultimul timp problema eliminării virusului prin urină a făcut obiectul a numeroase cercetări.

Nasemann şi Nagai (137) consideră că, datorită ubicuităţii sale, virusul herpetic este prezent şi în tractul urinar.

Schultz (175 *a*) izolează virusul din urina şoarecilor cu boală herpetică experimentală.

Beswick (8), bazat pe leziunile histopatologice puse în evidenţă în rinichiul şoarecilor infectaţi experimental pe cale intraperitoneală cu virus herpetic, consideră că în infecţia herpetică există şi o diseminare urinară.

Johnson (78) evidenţiază cu ajutorul anticorpilor fluorescenţi prezenţa leziunilor renale la şoarecii infectaţi intraperitoneal.

Jensen (76) inoculează virusul herpetic *simplex* cu ajutorul unui cateter uretral la şoareci sugari şi pune în evidenţă prezenţa virusului în urină după 6 ore de la infectare; cantitatea de virus creşte în 4 pînă la 5 zile de la infectare şi animalele mor în proporţie de 80%, cu leziuni renale.

Scanned with OKEN Scanner

Schultz și Neva (176) constată că șoarecii infectați pe cale intraperitoneală fac o paralizie ascendentă cu prezența virusului în urină la 34% din cele 101 animale testate. După autor virusul apare numai la șoarecii cu paralizii, între 4 — 12 zile de la infecție, și persistă pînă la moartea animalelor.

Prezența virusului în sînge, însă în cantitate mică, sugerează autorilor că existența virusului în urină nu s-ar datora trecerii sale din sînge în urină, ci ar fi rezultatul multiplicării sale în tractul genito-urinar în cursul diseminării infecției.

Weller și Hanshaw (199), cu ocazia studiului epidemiologic al virusurilor citomegalice, izolează din urina unui individ normal virusul herpetic.

Jensen (76) izolează de asemenea virusul din urina unui bolnav suferind de o pielonefrită cronică.

Smorodințev (180) a demonstrat că în infecția herpetică virusul este prezent în urină numai în momentul apariției bolii diseminate.

D. CĂILE DE MIGRARE A VIRUSULUI ÎN ORGANISM

Asupra căii de migrare a virusului herpetic *simplex* către sistemul nervos central atît în infecția naturală cît și în cea experimentală la animal, produsă prin inoculări extraneurale, au fost emise teoriile neurală și hematogenă.

S-a demonstrat că virusul herpetic inoculat pe cale periferică (cornee, piele, mucoasă oculară, nazală sau genitală etc.) se propagă centripet, în lungul nervilor, și determină în nevrax leziuni caracteristice, urmate de cele mai multe ori de sfîrșit letal.

Prin colorație supravitală cu albastru de tripan, McClellan și Goodpasture (125) constată că la iepurii infectați cu virus herpetic pe cale corneeană, cerebrală sau cutanată, sediul leziunilor din nevrax corespunde porții de intrare a virusului în organism (nucleul perechii V în cazul inoculării pe cornee; cornul Ammon în cazul inoculării intracerebrale; regiunea dorsală a măduvei în cazul inoculării tegumentare a membrului inferior).

Folosind proteinele serice omologe radioiodate în determinarea localizării leziunilor inflamatorii la iepurele infectat periferic cu virusul herpetic *simplex*, Boyse, Morgan, Pearson și Payling (17) constată că după inocularea în nervul median, radioactivitatea maximă este prezentă în porțiunile 3 și 4 ale măduvei (C_5 — C_6 și C_7 — C_8 — T_1), deci acolo unde se găsesc conexiunile centrale ale plexului brahial; curbele radioactivității obținute la animalele inoculate în primul nerv spinal lombar au arătat un maxim în porțiunea a 11-a a măduvei (segmentul de origine al acestui nerv), radioactivitatea fiind de asemenea crescută atît în regiunea sacrată cît și în cea cervicală și cea bulbară; la animalele inoculate în scia-

tic cea mai mare radioactivitate a fost detectată în porţiunea a 16-a măduvei (L_7 — S_1), descrescînd logaritmic în direcţia cefalică.

Coroborînd datele obţinute prin radioactivitatea exprimată în echivalenţe plasmatice cu leziunile histopatologice, autorii evidenţiază existenţa unei strînse corelaţii între ele.

Gaviati (52) a presupus că prin inoculare pe cornee de iepure, virusul herpetic trece în mucoasa olfactivă prin canalul nazo-lacrimal şi de aici, mai departe spre sistemul nervos central, prin bulbii olfactivi.

S-a demonstrat apoi de către Goodpasture (62) că la iepurii cu encefalită prin contact, virusul herpetic trece prin mucoasa bucală şi nazală şi ajunge în sistemul nervos prin ramura senzitivă a perechilor 5 şi 9, sediul leziunilor fiind în nucleii acestor nervi.

Inoculînd virusul herpetic prin instilaţie nazală, Levaditi şi Haber (92), Levaditi, Hornus şi Haber (102) pun în evidenţă prezenţa leziunilor în ganglionul Gasser şi bulbii olfactivi şi consideră că virusul ajunge în creier mai degrabă pe calea nervului trigemen decît pe calea nervului olfactiv, extirparea chirurgicală a bulbilor olfactivi neîmpiedicînd apariţia encefalitei.

Ca şi la alte virusuri neurotrope, s-a constatat că virusul herpetic inoculat în muşchii coapsei la iepure determină aceeaşi boală nevraxică obţinută după infecţia corneeană. La animalele la care s-a secţionat sciaticul 16 zile înainte de inocularea virusului în coapsă, nu s-a mai produs această infecţie nevraxică; germenii inframicrobieni herpetici n-au mai putut ajunge pînă la sistemul nervos central, calea de acces fiind tăiată prin secţionarea sciaticului care inerva regiunea inoculată.

Dar, germenul nu parcurge numai traiectul nervos ascendent *centripet*, ci — tot pe cale nervoasă — se poate dispersa *centrifug* şi poate produce o septinevrită (Nicolau şi colab.). La moartea unui animal inoculat intracerebral virusul poate fi găsit în nervii periferici, nerv optic şi retină (93 *a*) (160). Această diseminare centrifugă — împreună cu septinevrita consecutivă — se poate produce oricare ar fi poarta de intrare în organism a germenilor herpetici (141).

La iepure, virusul herpetic se poate deci generaliza în organism pe cale centrifugă; această diseminare se efectuează pe cale nervoasă cînd infecţia a fost instituită central (fig. 62) sau periferic (fig. 63). Prin acest proces de generalizare a germenilor în tot sistemul nervos (septinevrita), virusul poate atinge nu numai regiunile învecinate, dar chiar nervii şi formaţiunile nervoase ganglionare, unde se găsesc adesea leziuni.

Tulpinile de virus herpetic proaspăt izolate de la om, care nu sînt supuse la pasaje cerebrale seriate la iepure, introduse în creierul acestei specii animale, provoacă mai frecvent septinevrita (fig. 64) decît tulpinile antrenate şi adaptate la creier prin serii îndelungate de pasaje intracerebrale (82).

La *om*, herpesul are anumite manifestări, ce pot fi corect interpretate prin explicaţia fiziopatologică a septinevritei. E cunoscută descrierea

Scanned with OKEN Scanner

herpesului nevralgic al lui Mauriac: „cu prilejul unui herpes genital, bolnavul resimte brusc în regiunea genito-anală dureri violente, paroxistice și iradiante, dureri nevralgice; curenții dureroși parcurg mușchii inferiori, urmăresc traiectul sciaticului, traversează regiunea fesieră, în

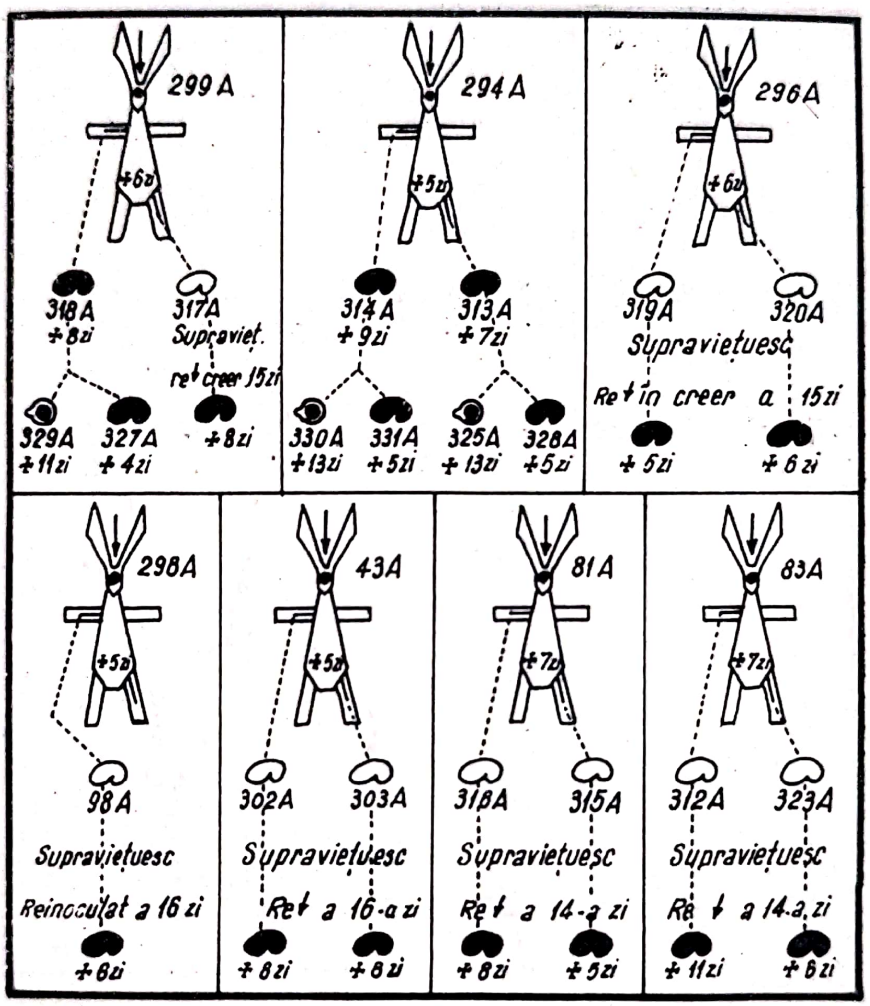


Fig. 62. — Septinevrită la iepurii inoculați intracerebral cu virus herpetic. Nicolau și Dimăncescu-Nicolau, 1928.

timp ce în lombe are senzații de curbatură; în același timp apar crize de hiperestezie în regiunea genito-urinară și anală, cu tenesme și chiar cu spasme ale sfincterelor. Toate aceste simptome durează 24 sau 48 de ore, după care erupția herpetică apare. Cu aceasta, totul se calmează progresiv și o dată cu apariția veziculelor dispar și nevralgiile" (Levaditi, 91).

Simptomatologia nevralgică precedînd erupția se poate instala și în alte părți ale organismului decît în sfera genitală, în cazul unui herpes recidivant (138).

Se constată astfel că în anumite cazuri de herpes nevralgic, simptomele nervoase *preced* erupţia cutanată ; totul se petrece ca şi cînd virusul *coboară* din nevrax spre periferie pe calea nervului interesat, provocînd o septinevrită trecătoare, localizată.

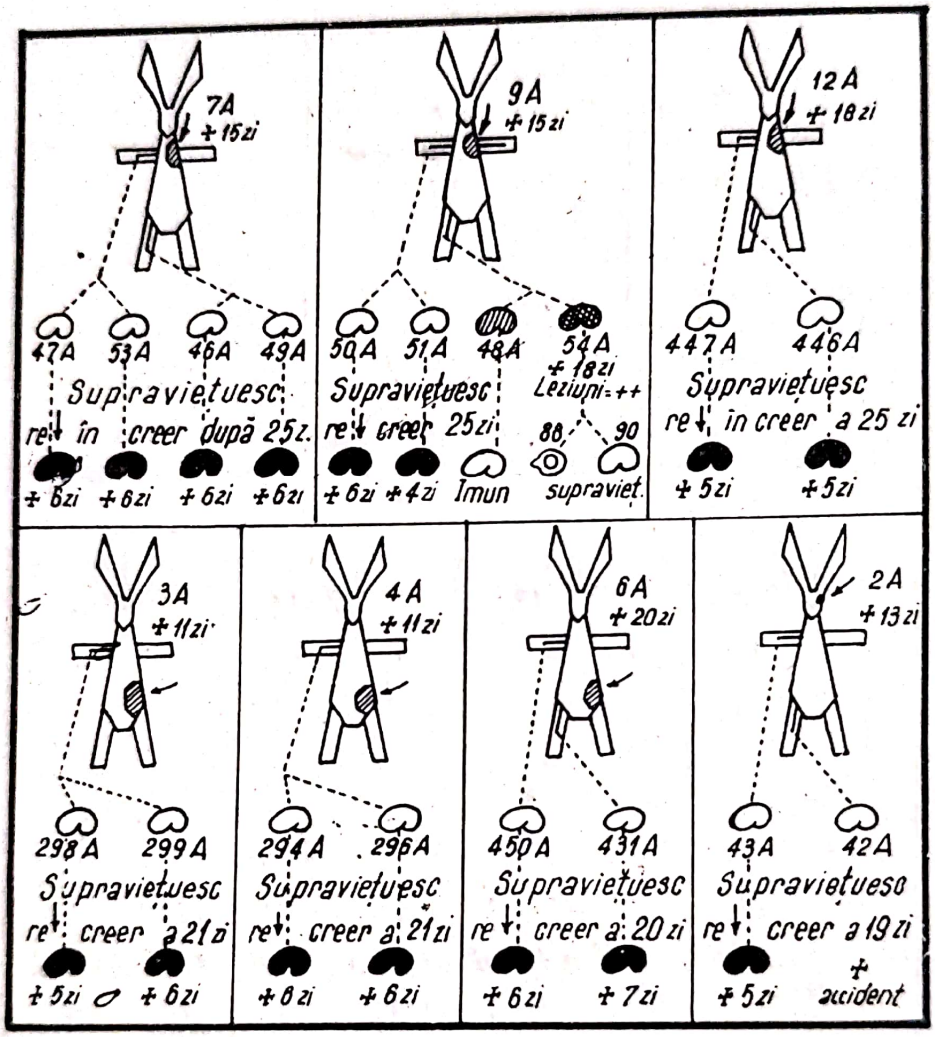


Fig. 63. — Septinevrită la iepurii inoculaţi pe piele cu virus herpetic. Nicolau şi Dimăncescu-Nicolau, 1925.

E evidentă, în aceste cazuri, participarea sistemului nervos central la infecţie, după cum dovedeşte pleiocitoza din lichidul cefalorahidian al bolnavilor de herpes genital, pleiocitoză ce precede apariţia erupţiei tegumentare.

Herpesul tegumentar apare astfel ca un fenomen secundar, o expresie periferică exteriorizată a unei septinevrite mai mult sau mai puţin manifeste, coborîtă din nevrax, localizată la un trunchi nervos determinat, produsă de diseminarea centrifugă a virusului.

Scanned with OKEN Scanner

S-au semnalat cazuri de meningită herpetică, urmată de erupții cutanate. S-a studiat și un caz mortal de herpes recidivant experimental la om, care este un exemplu caracteristic de septinevrită herpetică cu encefalită (141).

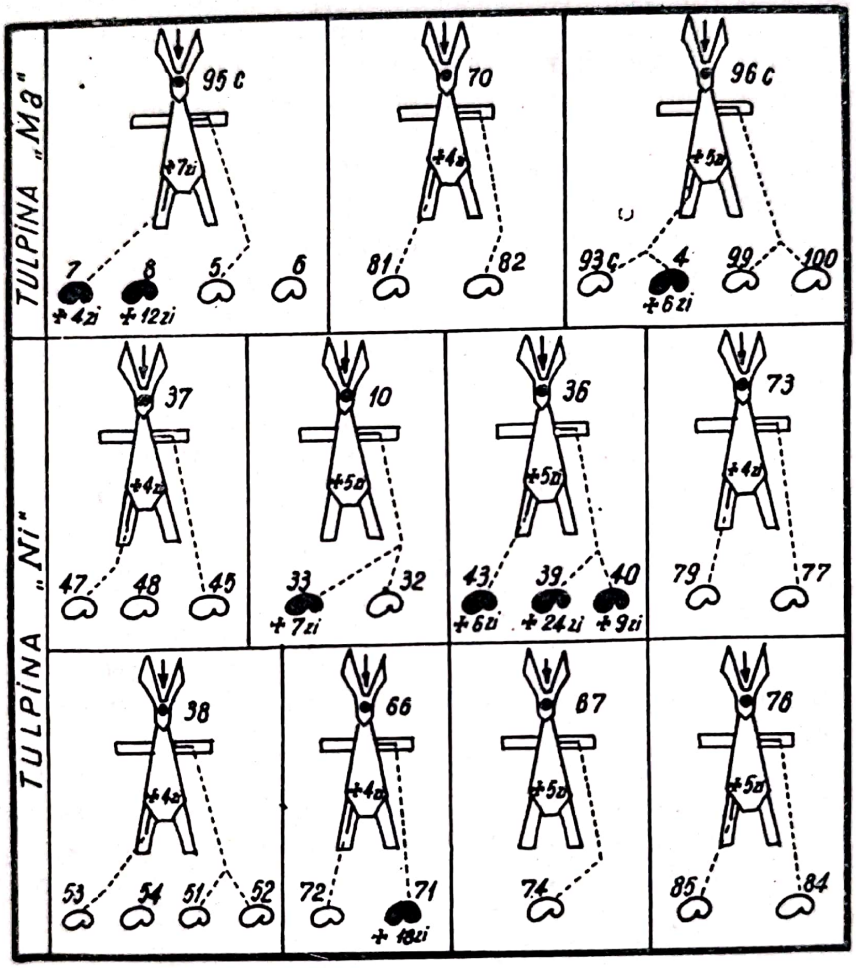


Fig. 64. — Septinevrită la iepurii inoculați intracerebral cu o tulpină de virus herpetic proaspăt izolată de la om. Kopciowska și Stroian, 1929.

Virusul herpetic a fost găsit de mulți cercetători în creier, în măduvă, în lichidul cefalorahidian, în ganglionii spinali, la indivizi care nu sufereau în mod aparent de herpes. A fost găsit în creier într-un caz de coree Sydenham, în lichidul cefalorahidian într-un caz de coree minor și într-unul de sifilis (vezi ubicuitatea virusului).

Virusul herpetic este un virus ubicuitar. El se poate găsi în organismul uman, în stare de virus biofit, în nevrax sau în ganglionii spinali, unde poate subsista în stare de viață latentă.

De acolo, cu prilejul unui apel făcut de o zonă de receptivitate anormală a tegumentului, el se poate angaja prin trunchiul nervos respectiv şi poate determina o erupţie cutanată. Aceste zone cu receptivitate anormală crescută pot fi prilejuite de modificări iritative locale, cataplasme, traumatisme sau de metabolismul celular modificat prin cauze emanînd din centrii nervoşi superiori (herpes emotiv), sau încă de modificări metabolice celulare ocazionate de hormoni (herpes catamenial etc.). Văzute în acest mod, erupţiile de herpes nevralgic, adesea cele de herpes recidivant, uneori chiar erupţiile cu eflorescenţă peribucală, pot fi considerate ca manifestări secundare ale unor procese septinevritice localizate la trunchiul nervos al regiunii interesate (Nicolau).

O erupţie de herpes tegumentar poate avea echivalentul său într-un organ care conţine neuroni, afinitatea germenului fiind tot atît de marcată pentru epiteliul tegumentar cît şi pentru elementele nervoase. În acest fel se poate pune problema dacă procesul de dispersie a virusului pe cale nervoasă, centrifugă, nu ar putea explica în anumite cazuri unele tulburări funcţionale trecătoare sau durabile ale diferitelor organe (pancreas, capsule suprarenale, cord, stomac, intestin etc.) (Nicolau).

Problema migraţiei virusurilor neurotrope prin nervi a dat naştere la lungi discuţii. Merge virusul prin teaca limfatică a nervului, prin spaţiile limfatice intratronculare, prin axoni sau chiar prin cilindrax ?

S-a considerat că virusul herpetic, ca şi virusurile rabic şi poliomielitic, inoculat periferic, ajunge în sistemul nervos central pe calea neuroaxonilor. Problema a fost însă mult discutată pînă în 1923, cînd Marinescu şi Drăgănescu (121), pe de o parte, şi Goodpasture şi Teague (64), pe de alta, au adus date asupra patogeniei infecţiei herpetice experimentale la iepure.

Autorii români, studiind în diverse etape procesul inflamator determinat de virus în trecerea sa de la locul inoculului (cornee) spre nevrax, constată în prima etapă leziuni inflamatorii în nervii ciliari, ganglionul oftalmic, ganglionul Gasser şi rădăcina descendentă a trigemenului bulbar (fig. 65, 66 şi 67), pentru ca în cea de-a doua etapă virusul să difuzeze în restul sistemului nervos central, determinînd leziuni inflamatorii maxime în zona de elecţie (hipocamp), descrisă de Levaditi Harvier şi Nicolau (100).

Goodpasture şi Teague au arătat că virusul herpetic inoculat pe corneea de iepure ajunge în sistemul nervos central pe calea nervului trigemen. De asemenea observă că virusul inoculat în muşchiul maseter se propagă de-a lungul nervilor motori sau de-a lungul nervului vag dacă inoculul se face traheal.

Şi un grup şi celălalt de autori ajung la concluzia că virusul herpetic inoculat pe cornee la iepure ajunge în nevrax pe căi nervoase. Migrarea virusurilor neurotrope prin nervi a fost numită de Marinescu „odogeneză" (propagarea pe cale preformată), de Levaditi (91) „neuroprobazie" (probasion = mers înainte), de Rose şi Walthard (173) „spontanneurotropie",

Scanned with OKEN Scanner

de Goodpasture și Teague (64) „stereotropism" și de Olitski, Sabin și Cox (150) „neuroinvazie".

În ceea ce privește însă modul cum se propagă virusul de-a lungul căilor nervoase interpretările date de Marinescu și Drăgănescu au fost diferite de acelea ale lui Goodpasture și Teague.

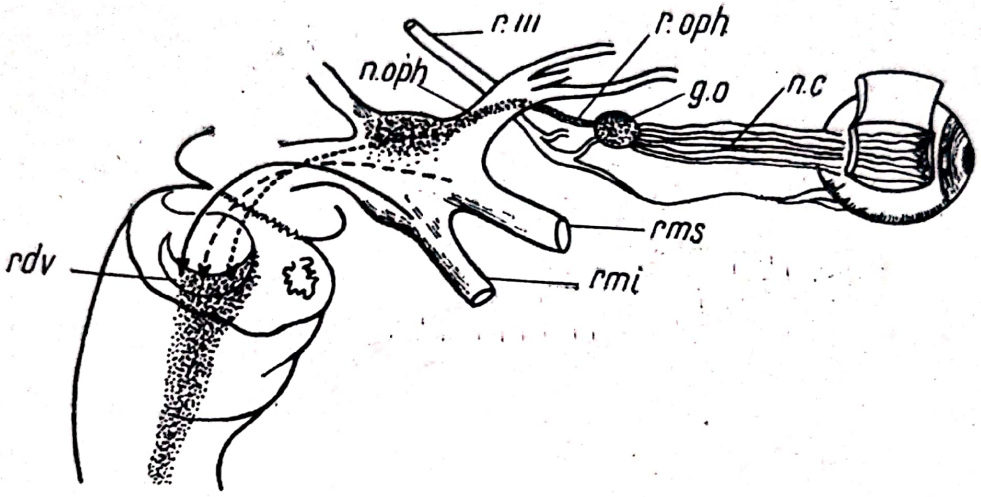


Fig. 65. — Propagarea virusului herpetic inoculat pe cornee la iepure, în lungul nervilor ciliari (*n.c.*), la ganglionul ciliar (*g.o.*), la rădăcina sa senzitivă (*r.oph.*), la nervul oftalmic (*n.oph.*), pînă în partea externă a ganglionului Gasser, iar de aici în bulb prin rădăcina descendentă a trigemenului al cărei cîmp este în degenerescență necrotică; în *r.m.s.*, rădăcina nervului maxilar superior; în *r.m.i.*, rădăcina nervului maxilar inferior; în *r.d.v.*, rădăcina descendentă a trigemenului; în *r.III*, rădăcina nervului oculomotor comun. Marinescu și Drăgănescu, 1923.

Primii autori au considerat că virusul herpetic se propagă prin interstițiul dintre fibrele nervoase, în timp ce Goodpasture și Teague au emis ipoteza unei propagări axonale.

Ulterior, interpretarea dată de Marinescu și Drăgănescu a fost admisă și de Bing și Walthard (12). Mai tîrziu, Field (37), reluînd aceste experiențe, obține aceleași rezultate în ceea ce privește calea prin care virusul inoculat pe cornee sau în mușchiul maseter ajunge în sistemul nervos central și conchide asupra propagării sale prin spațiile dintre fibrele nervoase.

Wright (201) de asemenea, reluînd în discuție problema propagării virusurilor neurotrope și în special a virusului herpetic, ajunge la aceeași ipoteză emisă de Marinescu și Drăgănescu. Injectînd în nerv, cu o anumită presiune, o emulsie de particule fine de cărbune, autorul constată că particulele ajung în ganglionul spinal prin spațiile dintre fibre. Datele obținute de Wright concordă cu acelea ale lui Margulis (120) care, injectînd torotrast în nervul sciatic, observă o migrare a acestei substanțe în perinerv, pînă în capsula ganglionului spinal.

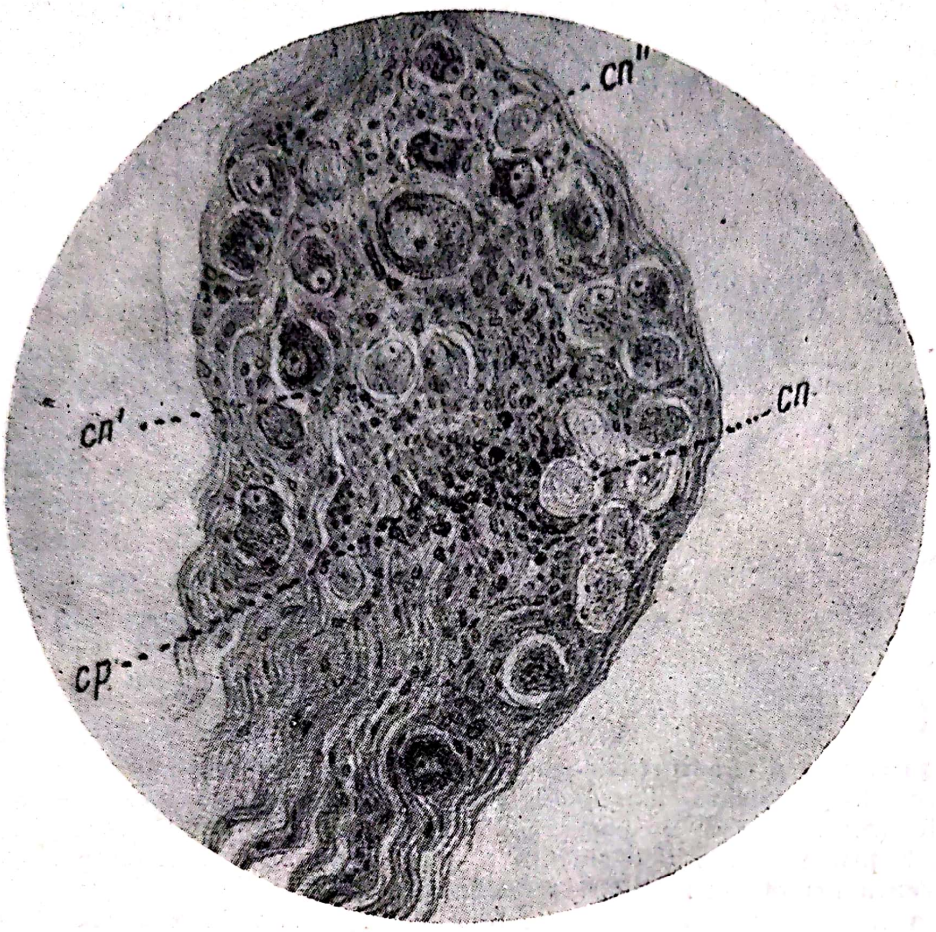


Fig. 66. — Ganglion ciliar de aceeaşi parte a corneei inoculate cu virus herpetic. În C*n*, C*n'* şi C*n''*, celulele nervoase reduse de volum şi în cromatoliză. Infiltraţie interstiţială cu celule plasmatice (*cp*). Marinescu şi Drăgănescu, 1923.

Fig. 67. — Ganglion Gasser, la nivelul originii nervului oftalmic. Sînt prezente leziunile pericelulare sub formă de infiltraţie determinată în mare parte de hiperplazia celulelor capsulare şi glomerulare (*np* şi *np'*). Atrofia celulelor nervoase şi leziuni de cromatoliză (*ch*, *ch'*). Marinescu şi Drăgănescu, 1923.

Scanned with OKEN Scanner

Utilizînd tehnica de imunofluorescență, Johnson (78) studiază patogeneza infecției herpetice la șoarecele sugar infectat pe diverse căi; constată la 24 de ore de la inocularea intracerebrală prezența fluorescen-

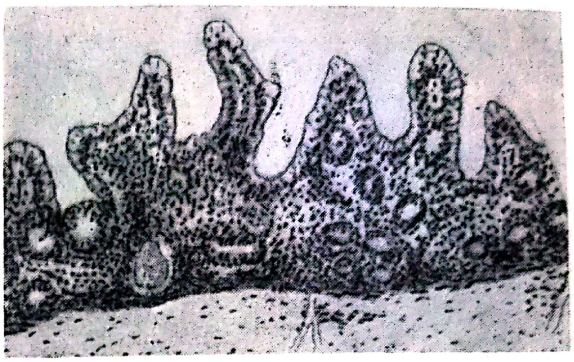
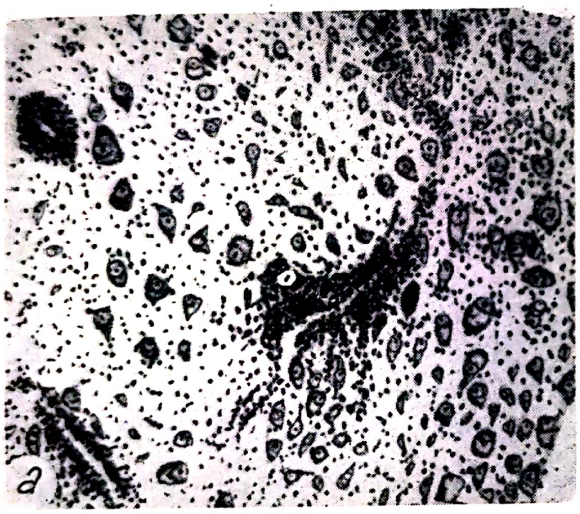
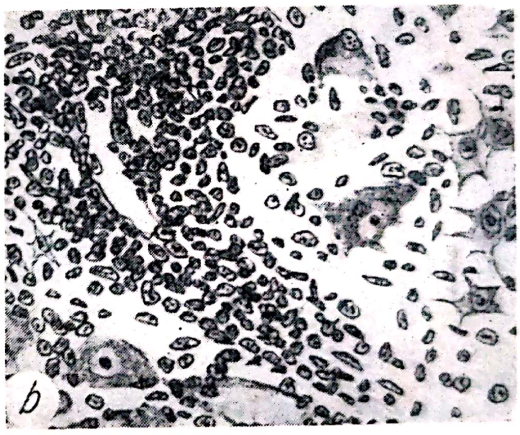


Fig. 68. — Propagarea virusului herpetic inoculat în peretele ansei intestinale la iepure. Secțiune transversală prin peretele ansei intestinale la locul de inoculare. Proces infiltrativ în stratul submucos și în axul vilozităților intestinale. Drăgănescu și colab., 1954.





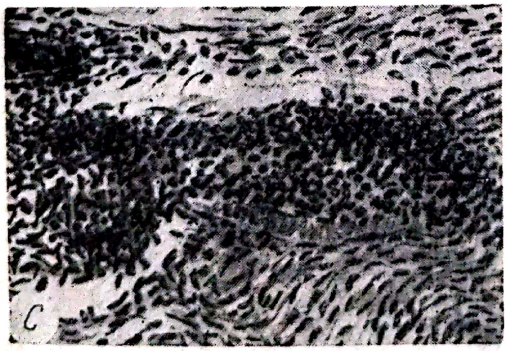


Fig. 69. — Propagarea virusului herpetic inoculat în peretele ansei intestinale la iepure.

a. Infiltrație masivă perivasculară și ușoară proliferare a elementelor interstițiale din ganglionul celiac.

b. Infiltrație limfocitară perivasculară și cromatoliza unor celule vegetative din ganglionul celiac.

c. Infiltrație interstițială masivă cu elemente limfocitare în trunchiul simpatic interganglionar. Drăgănescu și colab., 1954.

ței în celulele leptomeningelui și ependimului, iar la 48 — 72 de ore aceeași fluorescență în celulele neuronale și gliale din focarele submeningiale, fapt ce-l determină să considere că după inocularea pe această cale viru-

sul se dispersează rapid în lichidul cefalorahidian, se multiplică în meninge şi ependim şi apoi invadează neuronii şi celulele gliale.

Prin inocularea extraneurală virusul se propagă spre sistemul nervos central atît pe cale neurală cît şi hematogenă. La animalele infectate

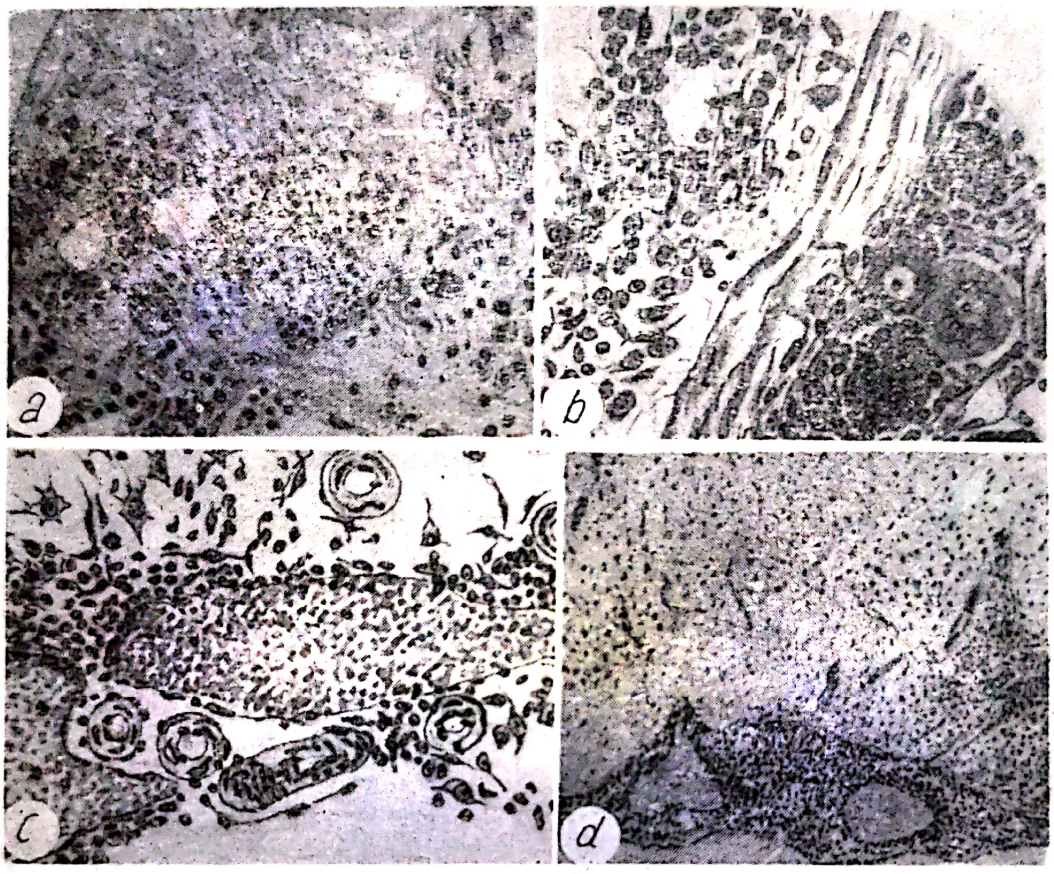


Fig. 70.—Propagarea virusului herpetic inoculat în peretele ansei intestinale la iepure.

a. Infiltraţie perivasculară şi interstiţială în polul extern al ganglionului rahidian dorsal.

b. În jurul unor celule nervoase din ganglionul rahidian dorsal, hiperplazia elementelor satelite. În spaţiul epidural, intens proces inflamator.

c. Proces leptomeningitic cu aglomerări de limfocite la nivelul unghiului ponto-cerebelos.

d. Leptomeningită intensă în regiunea hipocampului şi procese infiltrative perivasculare cu proliferare glială difuză în cortexul subiacent. Drăgănescu şi colab., 1954.

intraperitoneal fluorescenţa este pusă în evidenţă mai întîi în viscere (celule hepatice, splenice, pulmonare, renale, corticosuprarenale) şi apoi în sistemul nervos central.

În creier fluorescenţa apare mai întîi în jurul vaselor şi apoi în celulele neuronale şi gliale. După autor virusul se multiplică mai întîi în viscere şi de aici pe cale hematogenă invadează sistemul nervos central.

Scanned with OKEN Scanner

Teissier, Gastinel și Reilly (191) au demonstrat că inocularea virusului în diverse viscere sau glande (ficat, rinichi, pancreas, suprarenală, splină, ovar, tiroidă, glande salivare), sau în măduva osoasă, determină în majoritatea cazurilor apariția unei nevraxite, cu absența virusului și

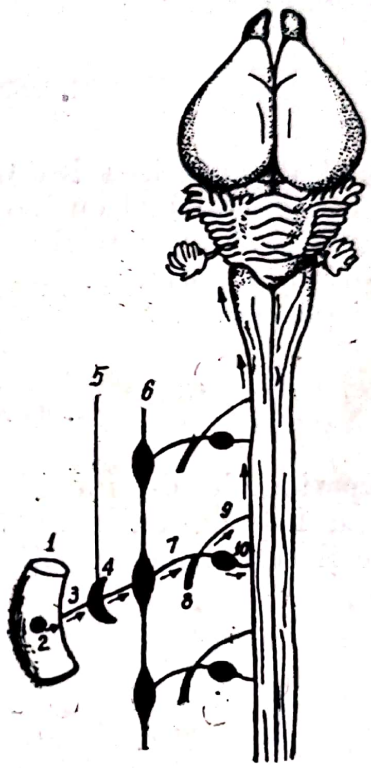


Fig. 71. — Schemă reprezentînd căile vegetative de la nivelul interoreceptorilor intestinali și pînă în nevrax la iepure, în lungul cărora se propagă virusul herpetic inoculat în peretele ansei intestinale. În *1*, ansă intestinală; în *2*, locul de inoculare; în *3*, filet nervos mezenteric; în *4*, ganglion celiac; în *5*, nerv pneumogastric; în *6*, lanț ganglionar simpatic; în *7*, ramuri comunicante; în *8*, nerv rahidian; în *9*, rădăcină anterioară; în 10, rădăcină posterioară cu ganglion spinal.
→ indică direcția propagării virusului.
Drăgănescu și colab., 1954.

a leziunilor inflamatorii în organele inoculate. Cu această ocazie, autorii studiază morfologic și calea vegetativă (formațiile cenușii vegetative abdominale, trunchiul simpatic etc.) pe care ar fi putut-o urma virusul în propagarea sa spre nevrax.

Drăgănescu și colab. (33), luînd în considerare faptul că peretele intestinal este foarte bogat în interoceptori și că singura cale nervoasă de legătură cu nevraxul o fac căile vegetative, studiază morfologic propagarea virusului pe calea vegetativă după inocularea sa în peretele intestinal, la iepuri. Autorii pun în evidență prezența de leziuni inflamatorii la locul de inoculare a virusului (fig. 68), în formațiile vegetative ale regiunii celiace și periaortice, cît și în trunchiurile nervoase interganglionare (fig. 69). Localizarea procesului inflamator în aceste formațiuni reprezintă prima etapă a propagării virusului spre nevrax. În a doua etapă, virusul pătrunde în nevrax urmînd calea lanțului simpatic, ramurilor comunicante, ganglionilor spinali (fig. 70), rădăcinile rahidiene și probabil calea pneumogastrică. Rezultatele acestor experiențe le-au permis autorilor să demonstreze încă o dată că virusul herpetic urmează,așa după cum se vede în figura 71, traiectele nervoase preexistente (fenomenul de odogeneză).

HERPESUL EXPERIMENTAL LA OM

Transmiterea herpesului de la om la om a fost realizată încă în cursul secolului trecut, însă studierea sistematică a herpesului experimental la om a început odată cu lucrările lui Grüter.

1. INOCULAREA PE CORNEE

După descoperirea lui Grüter, mulţi alţi experimentatori ((48) (3) etc.) au făcut inoculări cu herpes corneean uman pe cornee la om. Este important de relevat faptul că omul, mai rezistent decît iepurele la infecţia herpetică, *nu prezintă niciodată fenomene nervoase în urma inoculării virusului pe cornee.*

2. INOCULAREA PE PIELE

Experienţele de inoculare experimentală a herpesului pe pielea omului au fost numeroase ((44) (45) (189) (24) (18) etc.). Răspunsul la inoculare îl constituie apariţia locală de vezicule tipice (fig. 72), oricare

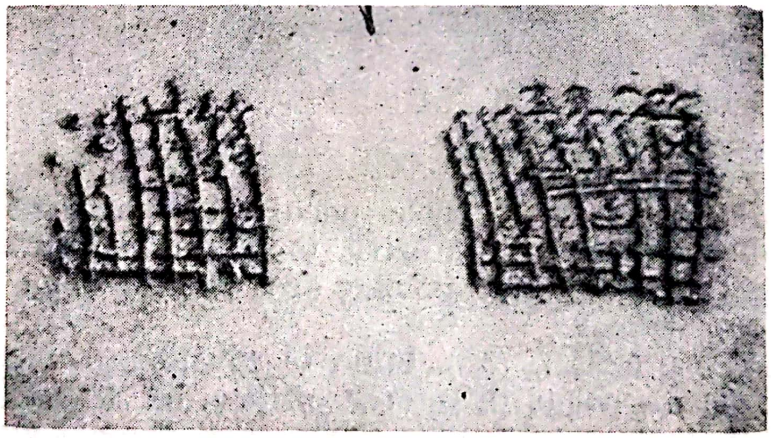


Fig. 72. — Herpes experimental uman. Se constată prezenţa veziculelor în lungul striurilor de scarificare. Teissier, Gastinel şi Reilly, 1922.

ar fi locul de inserţie tegumentară a germenilor. Pentru a realiza aceste infecţii experimentale există trei modalităţi:

a) inocularea la purtător (autoinoculare)

b) inocularea de la om la om (heteroinoculare)

c) inocularea la om a materialului recoltat de la animalul infectat experimental.

Scanned with OKEN Scanner

Inocularea la om a tulpinilor de virusuri trecute pe animal prezintă ca o particularitate faptul că virusul „animalizat" se arată puțin activ pentru tegumentele umane.

Virusul prelevat de la om se pretează așadar mai bine la acest mod de inoculare decît cel recoltat de la animal. Trecut de nenumărate ori pe piele la om, virusul nu-și modifică caracterele sale și nu capătă afinități neurotrope pentru om (193).

Rezultatele obținute prin inocularea virusului „animalizat" provenit de pe corneea sau creierul de iepure l-au condus pe Nicolau și Poincloux (144) la următoarea concluzie :

„Afinitatea ectodermică a virusului herpetic apare mai mare atunci cînd venind de la un animal, acest virus cultivă pe ectodermul propriu-zis al acestuia (piele, cornee) ; cînd este vorba însă de un virus adaptat pe ectoderm el are mai multă afinitate pentru specia animală pe care este cultivat în mod obișnuit (iepure) decît pentru alte specii îndepărtate (omul)".

În alți termeni : virusul herpetic cultivat pe corneea de iepure provoacă rar manifestări tegumentare la om ; cultivat în creierul de iepure el devine mai puțin patogen pentru pielea de om.

Nu este vorba de bogăția în germeni a materialului inoculat, ci de calitatea acestor germeni. Ansamblul experiențelor făcute în acest scop arată adaptabilitatea progresivă a virusului la o specie animală mai întîi, la un anumit țesut mai apoi, la plasticitatea acestui virus, tradusă prin posibilitatea de a-i conferi într-un mod manifest, proprietăți pe care el le posedă în potențial.

Acestea sînt caracteristice ale virusului ectodermozelor neurotrope.

Leziunile de heteroinoculare sînt autoinoculabile în serie, la anumite persoane pînă la al 7-lea pasaj. Deseori după 2 sau 3 pasaje, leziunea este constituită numai de o roșeață papuloasă fără veziculare.

Indivizii care nu mai reacționează la autoinoculare mai pot totuși răspunde la heteroinoculare prin erupții locale (190). Totuși, autoinoculările dau un număr mai mare de rezultate pozitive decît heteroinoculările (18) (195) (124) (50) (204) (205) (71) (72).

Numeroase inoculări herpetice au fost realizate la om în scop terapeutic, în urma constatărilor făcute în 1929 de Millian (129) (reactivarea printr-o erupție herpetică a seroreacției Bordet-Wassermann la sifilitici) și a ipotezei formulate de Naegeli (133) (134) (135) asupra antagonismului dintre spirocheta sifilisului și virusul herpetic.

3. INOCULAREA INTRARAHIDIANĂ

Tot în acest scop terapeutic, virusul provenit din creierul iepurilor morți de encefalită herpetică experimentală a fost inoculat în cavitatea rahidiană la numeroși bolnavi de encefalită letargică sau la parkinsonieni postencefalitici (90) (156) (145) (146) (68).

Scanned with OKEN Scanner

Inocularea intrarahidiană la parkinsonieni postencefalitici a suspensiei virulente de creier de iepure mort de encefalită herpetică experimentală poate determina, după Nicolau şi Poincloux o reacţie slabă sau nulă (lipsa febrei sau a meningo-encefalitei), sau o reacţie mai mult sau mai puţin intensă care durează 1 — 3 zile, sau cîteodată o uşoară „encefalită herpetică în miniatură" care durează 1 — 3 săptămîni şi a cărei vindecare constantă, aduce de obicei ameliorări importante sau chiar vindecarea bolii şi pe care Nicolau le consideră ca fenomene de paraimunitate.

Izolarea de către Nicolau şi Poincloux (146) a virusului herpetic din encefalita frustă, experimentală, prin inoculări de lichid cefalorahidian uman în creierul de iepure, demonstrează că boala este produsă de virusul herpetic şi nicidecum de proteinele străine (substanţa cerebrală de iepure). Totuşi prezenţa virusului în acest lichid este excepţională (146).

BIBLIOGRAFIE

1. Andervont, H. B. — J. Infect. Dis., 1929, *44*, 383.
2. Andervont, H. B. — J. Infect. Dis., 1929, *45*, 366.
3. Bastai, P., Busacca, A. — Klin. Wschr., 1924, *3*. 147.
4. Bedson, S. P., Crawford, G. J. — Brit. J. exp. Path., 1927, *8*. 138.
5. Bedson, S. P., Maitland, H. B., Burbury, Y. M. — 2nd Progr. Rep. Ft. Mth. Dis. Res. Comm. (App. 2) H. M. Stationery Office, London, 1927.
6. Berry, G. P., Slavin, H. B. — J. exp. Med., 1943, *78*, 305.
7. Beswick, T. S. L. — J. Path. Bact., 1958, *76*, 133.
8. Beswick, T. S. L. — J. Path. Bact., 1960, *79*, 69.
9. Biegelisen Jr., J. Z., Riley Jr., L. H., Scott, L. V. — Virology, 1957, *4*, 192.
10. Biegeleisen, Jr., J. Z., Scott, V. L. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1958, *97*, 411.
11. Bijl, J. P., Van Des Schaaf — Mededeelingu. het Inst. v. Praevent. Geneesk, 1934, Leyde, 51.
12. Bing, R., Walthard, B. — Arch. suisses Neurol. Psychol., 1928, *22*, 1.
13. Blanc, G. — C. R. Acad. Sci., 1921; *172*, 725.
14. Blanc, G., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, *84*, 629.
15. Blanc, G., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, *84*, 767.
16. Blanc, G., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, *84*, 859.
17. Boyse, A. E., Morgan, R. S., Pearson, J. D., Payling, G. — Brit. J. exp. Path., 1956, *37*, 333.
18. Bruni, F., — Eziologia dell'Herpes, 1923, Tip. Cooperat. Pavie.
19. Burnet, F. M., Lush, D. — J. Path. Bact., 1939, *49*, 241.
20. Cajal, N., Hung, Tao, Ionescu, V., Marinescu, G., Mateescu, S. — St. cerc. inframicrobiol., 1960, *11*, 219.
21. Cajal, N., Lissievici, E. — St. cerc. inframicrobiol. epidemiol. parazitol., 1952, *3*, 161.
22. Cepleanu, M., Cajal, N. — St. cerc. inframicrobiol., 1959, *10*, 349.
23. Cooke, B. T., Hurst, E. W., Swan, C. — Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 1942, *20*, 129.
24. Cowdry, E. W., Lucas, A. M., Neff, C. F. — J. Infect. Dis., 1935, *57*, 174.
25. Da Fano, C. — J. Path. Bact., 1923, *26*, 85.
26. Da Fano, C., Perdrau, J. R. — J. Path. Bact., 1927, *30*, 67.
27. Delorme M. — C. R. Soc. Biol., 1929, *101*, 121.
28. Dimitrieff — J. Hyg. Infektkr., 1926, *106*, 547.
29. Doerr, R., Hallauer, C. — Z. Hyg. Infektkr., 1936, *118*, 474.
30. Doerr, R., Schnabel, A. — Z. Hyg. Infektkr., 1921, *94*, 29.
31. Doerr, R., Vöchting, R. — Rev. Gén. Ophtal. Paris., 1920, *34*, 409.
32. Doerr, R., Zdansky, E. — Z. Hyg., 1924, *102*, fasc. 1 şi 2, 1.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 3

INFECȚIA NATURALĂ

EPIDEMIOLOGIE

Herpesul este cea mai comună și cea mai răspîndită boală a omului.

S-au descris mici epidemii de herpes. Astfel, între alți autori, Zimmerlin (203) a constatat în 3 luni 50 de cazuri de herpes printre personalul medical în unul din pavilioanele Bürgerspitalului din Bâle, în timp ce în aceeași perioadă de timp nici un infirmier din alt pavilion al spitalului nu a fost atins. Mayer (129) a semnalat într-o perioadă de 15 zile erupții herpetice labiale la 30 din 70 de soldați care dormeau în aceeași cameră și la 5 din 6 ofițeri din aceleași companii.

De Lavergne și colab. (46) au relatat o mică epidemie de herpes de aspect meningitic apărută în același salon de spital, la bolnavi cărora li se făcuseră puncții lombare. Audry (9) semnalează epidemii de herpes genital și menționează faptul, cunoscut clinicienilor, că există perioade cînd aproape toți bolnavii unui salon tratați prin arsenobenzoli prezintă pusee de herpes, în timp ce în alte perioade acest incident este rar sau inexistent.

Anderson și Hammilton (4) semnalează izbucnirea unei epidemii într-o colectivitate: 20 din 36 de copii sub 2 ani au prezentat o stomatită herpetică, iar restul de contacți au făcut o infecție subclinică, leziunile trecînd neobservate sau din contra localizate în altă parte (amigdale, stomac sau intestin).

Bastin, Verliac, Tournier, Laufer și colab. (12) aduc observațiile a 3 copii cu gingivo-stomatită apărută simultan.

S-au descris contaminări umane sigure prin contact sexual (33) (3) (98) (179) (183). Faptul fusese arătat în mod experimental la iepure încă din 1923 de către Levaditi și Nicolau (120).

Deși Biegeleisen și Scott (18) au reprodus experimental infecția herpetică transplacentară, la om acest mod de transmitere a virusului nu este încă sigur.

Este mai plauzibilă însă infecția nou-născutului prin contactul fătului în timpul expulsiei cu leziunile herpetice localizate pe organele genitale ale mamei.

Este foarte probabil că contaminarea interumană să se facă în natură prin picăturile de salivă, omul fiind adeseori purtător de virus herpetic în gură, așa cum au demonstrat Levaditi, Harvier și Nicolau încă din 1921 (119).

Scanned with OKEN Scanner

S-a putut demonstra că la indivizii cu stomatită herpetică virusul este eliminat prin salivă o perioadă de 7 săptămîni; în 2,5% din adulţii asimptomatici virusul este uşor izolat din salivă.

Studiile întreprinse de Buddingh şi colab. (36) au demonstrat de altfel că virusul este prezent în gura indivizilor de diverse vîrste însă procentul cel mai ridicat (20%) se găseşte între vîrsta de 7 luni şi 2 ani (fig.73).

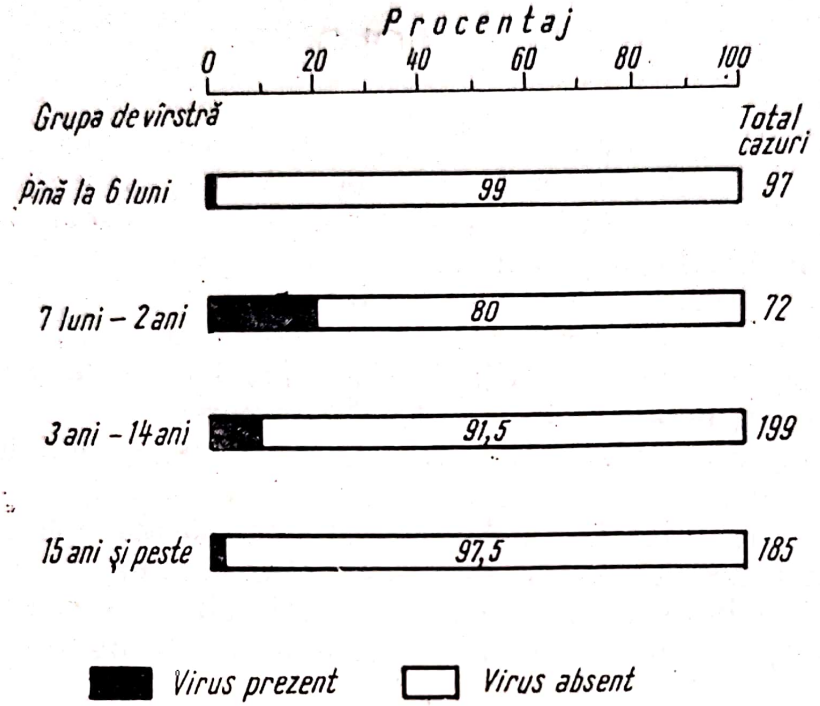


Fig. 73. — Procentul izolării virusului herpetic de la indivizi de diverse vîrste. Se observă că la copiii între 7 luni şi 2 ani virusul este prezent în gură la 20% din ei (forme inaparente de boală). Buddingh şi colab., 1963.

După Burnet (37) herpesul *simplex* ce apare la copilul mic este o infecţie primară acută, deseori febrilă, cu sau fără stomatită şi care datorită benignităţii sale, de multe ori nu ajunge în îngrijirea medicilor. Marea majoritate a micilor bolnavi menţin virusul în organism în tot cursul vieţii lor, deşi anticorpii apar la primul contact cu germenul inframicrobian.

Este dovedit faptul că anticorpii prezenţi în sîngele nou-născutului sînt anticorpi materni transmişi prin placentă; ei se menţin pînă la vîrsta de 4 — 6 luni la un titru aproape egal cu cel existent la adulţi (36), scad în titru între 4 — 6 luni şi 2 ani pentru ca apoi să crească treptat (fig. 74), ajungînd pînă la vîrsta de 5 ani de asemenea la titrurile populaţiei adulte (174). S-a demonstrat că la indivizii peste 15 ani anticorpii antiherpetici se găsesc, după unii autori, în proporţie de 84% (201), iar după alţii peste 90% (36), fapt ce demonstrează că o dată infectat, omul rămîne toată viaţa purtător de virus.

Scanned with OKEN Scanner

Slaba rezistență pe care o capătă individul cu ocazia primei infecții herpetice a copilăriei este suprimată de intervenția anumitor factori adjuvanți (traumatism, răceli, expunerea la raze ultraviolete, boală febrilă, tulburări digestive, discrinice, intoxicații etc.), permițînd virusului preexistent în organism de a-și manifesta proprietățile sale patogene sau de a ocaziona noi infecții herpetice exogene. Veziculele herpetice apar, se sparg și lichidul contaminează buzele, saliva și degetele, de unde posibilitatea infectării copiilor mici, care încă n-au făcut infecția primară.

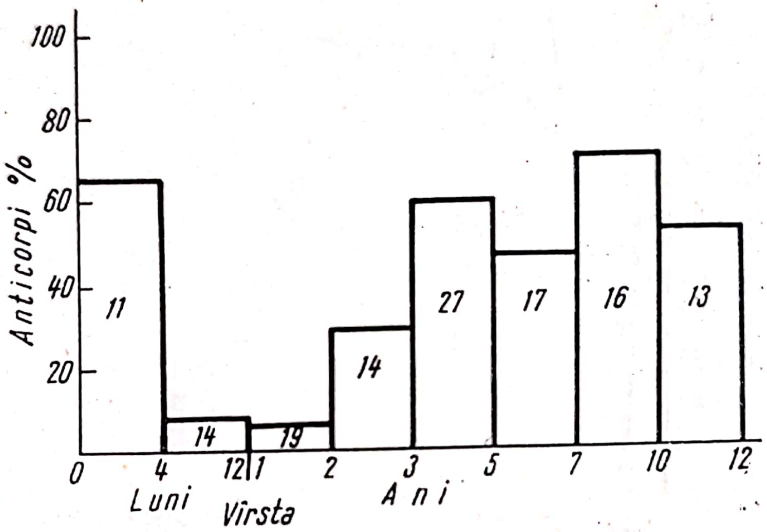


Fig. 74. — Incidența anticorpilor seroneutralizanți pe grupe de vîrstă. Scott și colab., 1953.

Scott și colab. (175) arată că incidența bolii clinice herpetice la copil este mai mare între 1 și 3 ani, deci atunci cînd nivelul anticorpilor serici este scăzut.

Fără a se putea explica, s-a observat însă că stomatita herpetică este mai rar întîlnită sub 1 an, vîrstă la care erupția variceliformă este mai frecventă.

La copiii mici, virusul herpetic *simplex* are ca poartă de intrare celulele mucoasei bucale sau celulele epiteliului cutanat al buzelor. Infectările pot fi directe, prin picăturile salivare de la cei din jur, prin sărut, sau indirect prin folosirea în comun a veselei sau prin manipularea diverselor alte obiecte contaminate. Această din urmă cale de transmitere pare să joace însă un rol mai mic datorită labilității virusului față de diverși agenți fizici (căldură, uscare, lumină solară).

La copiii mai mari și la adulți, șansele de infecție primară pe aceste căi sînt însă mai reduse. Aceasta a fost explicată de Burnet (37) ca fiind probabil datorită unei expuneri mai mici la contaminarea pe cale salivară și a unei rezistențe mai mari la această vîrstă.

Ca şi în cazul altor infecţii virotice sau bacteriene, infectarea copiilor cu virus herpetic are o incidenţă mai mare la cei cu condiţii de viaţă neigienice. Această opinie a fost confirmată de rezultatele obţinute de Coetzee (43); autorul cercetînd 417 copii din Bantu constată că anticorpii materni transmişi transplacentar se menţin în titruri ridicate pînă la vîrsta de 3 luni, pentru ca apoi între 3 luni şi 5 ani, să dispară la unii din ei. După vîrsta de 5 ani, anticorpii sînt prezenţi în 100% din cazuri, cea ce demonstrează că la această populaţie datorită condiţiilor de viaţă, infecţia herpetică primară are loc între 3 luni şi 5 ani.

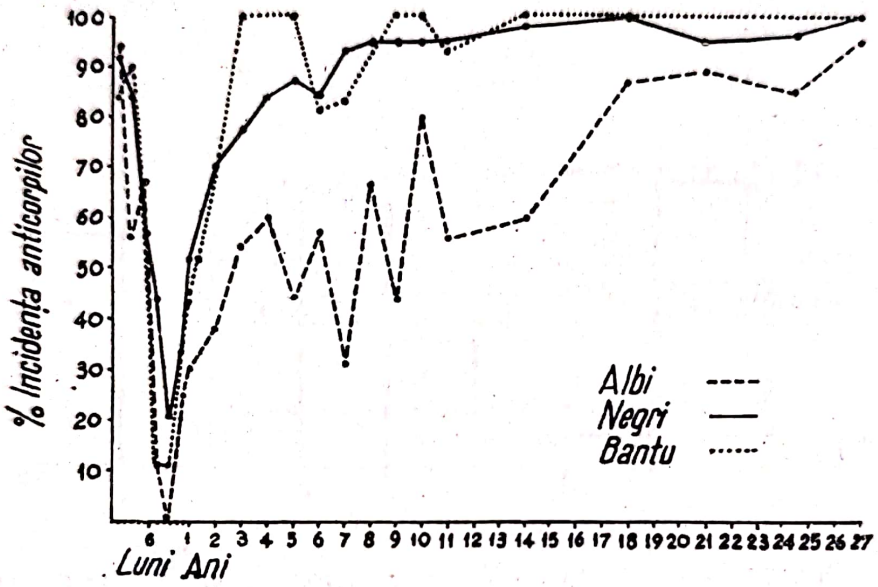


Fig. 75. — Incidenţa anticorpilor antiherpetici la albi, negri şi Bantuşi studiată la diverse vîrste. Becker, 1966.

De asemenea, Andrewes şi Carmichael (6), Burnet şi Lush (40) au pus în evidenţă unele diferenţe în ceea ce priveşte prezenţa anticorpilor herpetici în serurile recoltate de la europeni de diferite clase sociale. După Burnet şi Lush, anticorpii erau prezenţi la 93% dintre bolnavii internaţi în spitalul public, faţă de 37% din cadrele universitare.

Becker (13) cercetează de asemenea rolul factorilor social-economici în epidemiologia infecţiei herpetice. Testînd 2248 de seruri recoltate de la copii (albi, negri şi Bantuşi), autorul evidenţiază, imediat după naştere, prezenţa unui procent ridicat de anticorpi, cifrele obţinute fiind egale cu acelea ale adulţilor; după autor, această constatare ar fi un indiciu că anticorpii antiherpetici prezenţi la copii, imediat după naştere, sînt de origine maternă. Ei descresc treptat cu vîrsta în aşa fel încît între 6 — 10 luni titrurile sînt foarte scăzute; cresc apoi în mod progresiv după această vîrstă şi copiii se pot totuşi uşor infecta cu virus herpetic.

După autor, incidenţa maximă de anticorpi se găseşte, la Bantuşi către vîrsta de 4 ani, la negri către vîrsta de 8 ani şi la albi după vîrsta de 10 ani (fig. 75).

Scanned with OKEN Scanner

Din aceste cercetări reiese că anticorpii cîștigați de la mamă dispar între 6 și 10 luni. Ei au rol în prevenirea unei infecții herpetice la această vîrstă sau, dacă totuși ea apare, îmbracă o formă ușoară, uneori inaparentă.

Anderson și Hammilton (4) au arătat că pînă la vîrsta de 11 luni copiii nu fac infecția herpetică. Datele aduse de Becker au demonstrat însă că infecția herpetică primară poate apărea și la 3, $4^1/_2$, 5 și 6 luni, însă în mod obișnuit ea are loc între a 10-a lună și 4 ani.

BOALA LA OM

Infecția herpetică este foarte răspîndită atît la copil cît și la adult. La copil și în special la sugar, boala apare ca o primă infecție, cu o simptomatologie destul de variată și cu o evoluție deseori destul de gravă; o dată cu dispariția anticorpilor de origine maternă, de obicei către luna a 6-a de la naștere, copilul devine sensibil la infecția herpetică și face o boală fie aparentă clinic sau inaparentă (80 — 90% din cazuri), cu instalarea progresivă a imunității (172).

Boala afectează cu predilecție nou-născutul și apare cel mai frecvent sub forma unei stomatite beninge sau sub a unei infecții generalizate (septicemice) de gravitate extremă.

Diseminarea virusului în organism se face pe cale hematogenă, din aproape în aproape, sau chiar pe cale nervoasă. După multiplicarea locală, virusul poate difuza pe cale hematogenă și determină leziuni viscerale. Cea de-a doua cale de diseminare, prin continuitate de la o celulă la alta, a fost incriminată de Stocher (188) și Hoggan și colab. (95). Krücke (109), studiind un caz de encefalită la nou-născut, constată prezența leziunilor anatomice de la locul de multiplicare (cornee) pînă la sistemul nervos central și conchide asupra posibilității de migrare a virusului pe calea nervilor.

Prezența anticorpilor antiherpetici într-o proporție de 65 — 90% la persoanele adulte sănătoase demonstrează că în majoritatea cazurilor infecția primară are loc în copilărie. Aproximativ 47% din infecțiile primare apar sub 20 de ani (21% din ei, sub 10 ani), 32% între 20 și 39 de ani și 21% peste 50 de ani (36).

La adult boala poate apărea ca o primo-infecție, dacă individul nu s-a infectat în copilărie (165), sau ca o infecție recidivantă, în cazul cînd a făcut o formă aparentă sau inaparentă de boală și prezintă anticorpi neutralizanți în sînge.

Infecția herpetică primară a adultului, de intensitate variabilă (de la simptome generale moderate pînă la o adevărată „febră herpetică"), se

traduce clinic prin cheratită, erupţie cutaneo-mucoasă, stomatită, glosită, faringită sau printr-o simptomatologie nervoasă.

Virusul rămîne în organismul individului sub formă latentă, biofită, îşi exacerbează virulenţa în momentul cînd sub influenţa diverselor noxe pragul anticorpilor scade şi boala se manifestă sub formă de erupţie herpetică recidivantă.

Ea apare în cursul diferitelor maladii infecţioase (gripă, pneumonie, meningită cerebro-spinală, tifos exantematic, paludism etc.). În acest caz ia numele de *herpes simptomatic*. Alte cauze adjuvante pot declanşa apariţia erupţiilor herpetice simptomatice : *intoxicaţiile* cu iod, mercur, arsenic, cocaină etc. ; *injecţiile cu culturi microbiene omorîte* (vaccin TAB, culturi de bacili Coli etc.) ; *traumatismele* (herpesul labial al operaţilor şi răniţilor, herpesul genital, herpesul corneean consecutiv eroziunilor corneei, herpesul după rahianestezii, puncţii lombare, secţiuni ale ramurilor trigemenului, gasserectomii etc.) ; *şocurile umorale* (injecţii cu peptonă, cu seruri străine, lapte etc.) ; *tulburările endocrine* (herpes catamenial, „herpesul indiscret" al lui Fournier), în sfîrşit, chiar *emoţiile* ar fi susceptibile de a provoca erupţii herpetice la anumiţi indivizi predispuşi (91) (200).

Aşadar, deseori erupţia herpetică recidivează, însă există o formă de herpes propriu-zis „*recidivant*", care se manifestă ani de-a rîndul prin puseuri neregulate sau chiar prin puseuri ritmice sezoniere, cu dată fixă, apărînd în acelaşi loc sau tegument, sau în regiuni cutanate foarte învecinate.

În cazul apariţiei unei erupţii herpetice recidivante, anticorpii specifici sînt prezenţi în sînge şi fenomenele generale sînt de regulă foarte discrete sau chiar absente, iar leziunea cutaneo-mucoasă rămîne totdeauna localizată.

Manifestările clinice ale unei infecţii cu virus herpetic *simplex* se traduc prin leziuni ale tegumentelor, mucoaselor, sistemului nervos central sau prin simptome de generalizare cu atingerea organelor viscerale.

Atît determinările tegumentare cît şi cele ale mucoaselor se caracterizează clinic prin leziunea locală caracteristică şi prin semne generale.

Indiferent de localizare, leziunea tegumentară apare iniţial ca o zonă congestivă maculoasă de mărimea unui bob de linte cu senzaţie de usturime, înţepătură, arsuri şi prurit. În cîteva ore această maculă se transformă în veziculă de formă emisferică, perlată, cu un conţinut clar. După 4 — 6 ore, cît durează această perioadă de veziculaţie, apare adenopatia regională, mai mult sau mai puţin dureroasă. Veziculele, variabile ca număr (dela 1 pînă la 6 — 8 — 12), se sparg, se golesc de conţinutul lichidian şi în locul epidermului decolat se formează o crustă care apoi se detaşează şi cade, lăsînd o mică maculă roşcată ce se vindecă în decurs de o săptămînă fără a lăsa vreo cicatrice.

Erupţia herpetică a mucoaselor are aceleaşi stadii evolutive, însă fără formarea crustelor ; veziculele se sparg, se golesc de conţinutul lichi-

Scanned with OKEN Scanner

dian și lasă o ulcerație care, infectîndu-se secundar, se acopere adesea de false membrane.

Stadiul eruptiv al bolii „*le buton de fièvre*", este deseori precedat de fenomene generale abia perceptibile (ușoară curbatură, stare subfebrilă) sau, mai rar, foarte zgomotoase (frisoane, febră 40°, cefalee, anorexie, limbă saburală, artralgii) care dispar o dată cu apariția erupției.

Această formă de herpes, denumită herpes *simplex*, febril sau idiopatic, este localizat pe tegument (herpes labial, nazal, facial, prepuțial, digital, fesier etc.), pe mucoase (herpes bucal, amigdalian, faringian, esofagian, uretral, genital etc.) sau pe cornee (herpes corneean).

Cîteodată erupția herpetică cutaneo-mucoasă este precedată sau însoțită de fenomene nervoase. Astfel, în „herpesul nevralgic" al lui Mauriac durerile acute în trunchiurile nervoase ale regiunii bolnave sînt simultane sau preced apariția erupției, iar în herpesul recidivant ritmic sezonier (149) vezicularea pielei afectate de obicei de erupție este precedată deseori de dureri nevralgice localizate în membrul sau în regiunea interesată (147).

Relațiile dintre herpes și sistemul nervos central sau periferic sînt și mai evidente în observațiile publicate de Szymanowski și Zylberlast-Zand (190), Philibert (157), Nicolau și Poincloux (147), Léri și Lièvre (118), Achard (1), Brunsgaard (33), Thomas (193), Giampietro și Schneeberg (77) etc., observații în care herpesul este însoțit de tulburările meningitice, encefalitice, mielitice, nevritice, ajungînd cîteodată pînă la moarte (153) prin nevraxită.

În felul acesta, clinica a stabilit că herpesul determină în același timp manifestări cutaneo-mucoase, nervoase și viscerale, că germenul posedă, în afară de afinitatea dermotropă, o afinitate neurotropă și viscerotropă incontestabilă. Experiențele au confirmat existența acestor afinități ale virusului herpetic, indiferent dacă este recoltat din erupțiile idiopatice sau simptomatice, sau din erupțiile de herpes *simplex* sau herpes recidivant.

Virusul herpetic are un rol destul de important în patologia umană și determină multe forme de boală, unele din ele destul de grave.

Van Rooyen și Rhodes (198) și Scott (174) împart bolile determinate de virusul herpetic în „boli ale pielei, ale mucoaselor, ale sistemului nervos central și boli sistemice."

A. INFECȚII HERPETICE ALE TEGUMENTELOR

Localizarea tegumentară a herpesului este cea mai frecvent întîlnită. Leziunile apar în special la granița dintre piele și mucoase (buze, nas, organe genitale), pe pleoape, bărbie, pavilionul urechii, regiunea cefii etc.

Manifestările herpesului tegumentar sînt cunoscute sub denumirile de herpes *simplex* (herpes labial, facial, febril), *eczema herpeticum* (erupția variceliformă a lui Kaposi) și herpes traumatic (herpes de inoculare).

Scanned with OKEN Scanner

1. HERPESUL *SIMPLEX*

Poate apărea spontan sau după administrarea de vaccinuri, lapte, metale coloidale (68) (199), anestezice generale (99), piretoterapie (206) (105) etc.

Indiferent de locul unde apare, el se caracterizează prin prezenţa de vezicule a căror apariţie este precedată de cele mai multe ori de o senzaţie de arsură, înţepături în zona de piele respectivă; veziculele sînt dispuse în grupuri, au mărimea unui bob de linte şi un conţinut clar care se tulbură însă foarte repede.

De cele mai multe ori herpesul evoluează afebril şi fără prinderea ganglionilor regionali, sau eflorescenţa veziculară este însoţită de o limfangită (195).

S-a observat însă de către Slavin şi Ferguson (182) că prin distribuţia erupţiei, herpesul *simplex* este uneori greu de diferenţiat de zona zoster.

Localizarea sa palpebrală este mai rar întîlnită. Apare de obicei asociată cu alte erupţii herpetice localizate la nivelul feţei şi foarte rar ca o leziune izolată.

Erupţia herpetică palpebrală poate fi observată la toate vîrstele, cu frecvenţă mai mare însă la copil sub forma unei infecţii primare, însă cu predilecţie pentru sexul feminin.

Apariţia erupţiei este precedată de simptome premonitorii (usturime, înţepături) şi este identică cu aceea din herpesul cutanat, adică iniţial constituită dintr-o zonă eritematoasă acoperită de cîteva papule ce se transformă rapid în mici vezicule aşezate izolat sau în buchet. După cîteva zile acest eritem dispare, veziculele se acoperă de cruste care după ce cad lasă o mică zonă ulcerată care se vindecă fără cicatrice.

Erupţia poate fi localizată pe faţa cutanată a pleoapei, sau aşa cum se întîmplă cel mai frecvent, pe marginea ciliară a pleoapei, constituind ceea ce se numeşte „blefarita herpetică". Erupţia din blefarita herpetică poate fi constituită numai din cîteva vezicule sau, din contra, ele pot să fie numeroase şi confluente, determinînd chiar ulceraţii (32) (136).

Leziunea este uneori localizată şi limitată la marginea ciliară a pleoapei, sau, aşa cum se observă în general la copilul mic, ea este asociată cu un herpes labial sau narinar. Mai frecvent decît în herpesul palpebral, blefarita herpetică este însoţită de leziuni cherato-conjunctivale.

În anumite condiţii (febră, expunere la raze solare, ciclul menstrual) herpesul palperal poate apărea sub formă recidivantă pe aceeaşi regiune sau pe regiuni diferite.

Leziunea palpebrală din cursul erupţiei variceliforme a lui Kaposi este de intensitate mult mai mare; edemul, ulceraţiile şi secreţia hemoragică sau purulentă cu cicatrice definitivă după vindecare (în formele gangrenoase) sînt caracteristice acestei forme de boală herpetică.

Scanned with OKEN Scanner

2. ECZEMA HERPETICUM (ERUPȚIA VARICELIFORMĂ A LUI KAPOSI)

A fost descrisă în 1887 de Kaposi (103) ca o complicație apărută în cursul eczemei copilului. Ulterior, Juliusberg (102) denumește boala „pustuloza vacciniformă acută". O dată însă cu izolarea virusului herpetic de la cazuri cu erupție variceliformă, boala a căpătat denumirea de „eczema herpeticum". Unii autori (192) folosesc denumirea de „erupție varioliformă a lui Kaposi-Juliusberg".

Boala a fost inițial considerată de unii autori ca o infecție bacteriană, iar de alții ca o infecție virotică. În 1941, Seidenberg (177) izolează din veziculele unui bolnav cu acest sindrom un germene inframicrobian pe care îl identifică a fi virus herpetic. Ulterior, autori ca Wenner (207), Lynch (124), Lynch, Evans, Bolin și Steves (125), Jaquette, Convey și Pillsbury (101), Barker și Hallinger (11), Kipping și Downie (108), Ruchman, Welsh și Dodd (169), Ruchman și Dodd (168), Brain, Dudgeon și Phillpott (28), Fitzgerald și Booker (69), Starck (187), Finberg și Easton (65), Baker, Lawton și Mc. Carthy (10), Grist (83), Landman, Halonen, Ahvenainen, Valanne și Vourinen (114), Halonen (86), Thiers și colab. (192), Munro (139) publică cazuri de erupție variceliformă Kaposi de la care s-a putut izola virusul herpetic, iar serologic, în unele cazuri, s-a pus în evidență o creștere a titrului anticorpilor herpetici.

Fără a izola virusul, Dudgeon (55), Gajdusek, Robbins și Robbins (74) au evidențiat o creștere a titrului anticorpilor fixatori de complement în cazuri cu erupție variceliformă.

Alți autori, inoculînd lichidul vezicular intracerebral la șoarece, au obținut o encefalită ușoară, curabilă. Aceste date, coroborate cu rezultatele obținute prin testele serologice, i-au făcut să susțină că virusul vaccinal este agentul etiologic în unele cazuri cu erupție variceliformă a lui Kaposi.

Lamy și colab. (112) descriu apariția erupției variceliforme Kaposi la un copil eczematos care venise anterior în contact cu fratele său vaccinat Jennerian.

Rezultatele obținute de majoritatea autorilor stabilesc însă în mod clar că această entitate nosologică este de etiologie herpetică.

Boala reprezintă o formă destul de gravă a infecției herpetice primare, realizată fie direct prin autoinoculare, fie prin contactul cu personalul de spital care prezintă leziuni herpetice cutaneo-mucoase.

Poate apărea în familii (fig. 76). Matumoto și colab. (128) au avut posibilitatea de a studia două cazuri (mamă și copil) care s-au infectat probabil prin contact (bunica prezentase cu 9 zile înainte un herpes labial).

Evans, Bolin și Steves (62) au constatat însă prezența anticorpilor herpetici în perioada acută a bolii la cazurile de la care a fost posibilă izolarea virusului herpetic, dovedind prin aceasta că nu toate cazurile cu erupția Kaposi sînt infecții primare. Pette (156), Boake, Dudgeon și

Scanned with OKEN Scanner

Burnet (25) descriu erupţii herpetice recidivante, asemănătoare erupţiei variceliforme a lui Kaposi. În aceste cazuri, deşi leziunile locale sînt destul de întinse, determinările sistemice sînt prevenite de prezenţa anticorpilor antiherpetici.

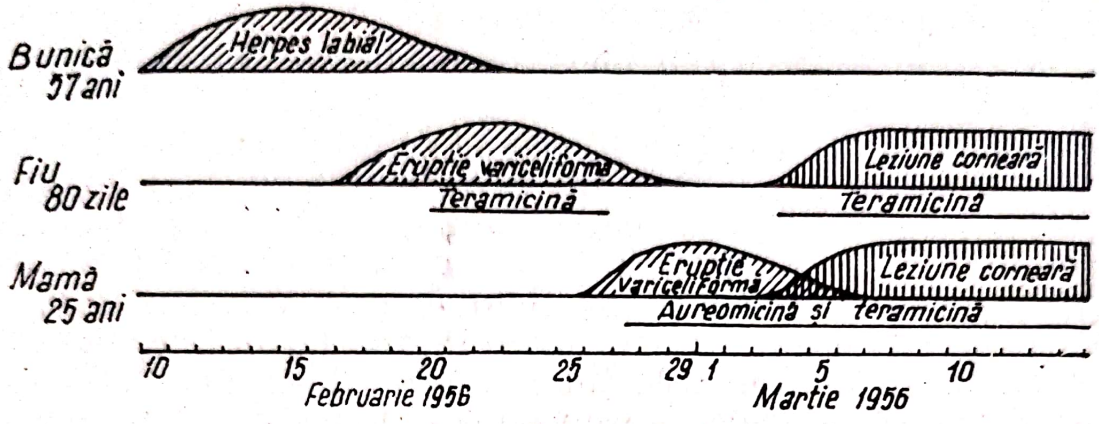


Fig. 76. — Erupţie variceliformă Kaposi apărută la 2 indivizi din aceeaşi familie după contagiu anterior cu un bolnav cu erupţie herpetică labială. Matumoto şi colab., 1958.

Boala apare la sugarul eczematos (neurodermită, impetigo, eczemă seboreică), la adolescent (139) şi la adult cu pitiriazis rozaceu Gibert (128)

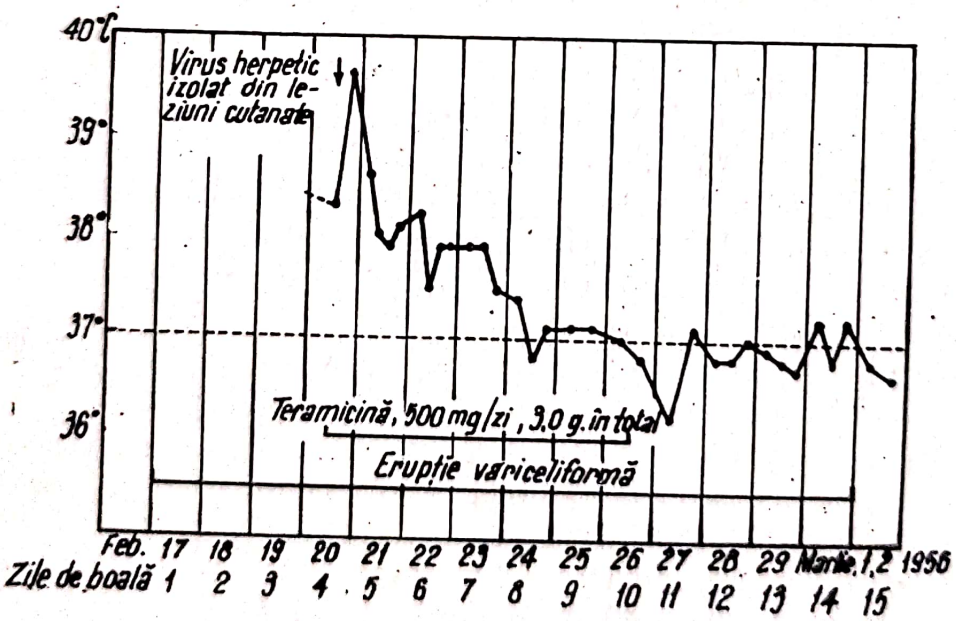


Fig. 77. — Aspectul curbei febrile în erupţia variceliformă Kaposi. Matumoto şi colab., 1958.

după o perioadă de incubaţie de 5 — 7 zile. Ea se caracterizează prin prezenţa semnelor generale (febră ridicată şi leucopenie) şi locale (erupţie şi adenopatie regională) (fig. 77).

Scanned with OKEN Scanner

Erupția este constituită din elemente eritemato-veziculare, uneori pruriginoase, de mărimea unui bob de linte, diseminate sau grupate. Leziunile eruptive au un aspect polimorf datorită diverselor stadii de evoluție a lor, așa încît sînt ușor confundate cu cele din varicelă.

În general, după 4 —5 zile de la apariția lor, veziculele se transformă în pustule care se ulcerează (uneori confluează interesînd regiuni întinse), capătă o crustă sero-hematică care cu timpul se usucă și cade, iar la locul leziunii rămîne doar o zonă de pigmentație, fără cicatrice. În formele gangrenoase, leziunile lasă după vindecare cicatrice definitive.

Erupția poate fi generalizată, sau cum se întîmplă cel mai frecvent limitată la regiunile centurii scapulare, coatelor și pumnilor. Sînt frecvente atingerile mucoasei bucale și faringiene.

În cazul interesării feței, erupția este localizată, cel mai frecvent la nivelul pleoapei și conjunctivei și mai rar la nivelul corneei și irisului. Manifestarea palpebrală are un aspect cu totul caracteristic prin intensitatea edemului, prin prezența unei secreții hemoragice sau purulente și prin aceea a leziunilor ulcerative.

Cînd procesul inflamator și eruptiv se întinde la nivelul conjunctivei, leziunea are aspectul unei cheratite dendritice, ulceroase sau punctiforme; iridociclita însoțește cel mai frecvent leziunea corneeană.

Boala durează 8 — 14 zile în formele ușoare și mai multe săptămîni în cele grave.

La adult și adolescent evoluția este favorabilă însă fenomenele generale sînt uneori extrem de severe (139). La copil și în special la copilul sub 1 an, evoluția bolii este gravă datorită alterării stării generale. La această vîrstă sindromul infecțios (infecțiile bacteriene secundare) și deshidratarea (prin vomismente și diaree) duc cel mai frecvent la exitus. Uneori, prin spargerea veziculelor se pierde o cantitate mare de lichid, electroliți și proteine, ducînd la o alterare profundă a stării generale.

Diseminarea virusului se face pe cale hematogenă și limfatică, așa încît atingerea organelor interne este o regulă.

Fenomenele encefalitice, foarte rare însă în această boală, au în genere o evoluție spre exitus.

Recent, Brain, Pugh și Dudgeon (29) aduc însă un caz la care evoluția spre letalitate a fost determinată de leziunile necrotice ale suprarenalelor.

Complicații. La unele cazuri s-au observat apariția complicațiilor otice, pleuro-pulmonare, urinare sau gastro-intestinale.

Diagnosticul de erupție variceliformă este posibil prin izolarea virusului herpetic din lichidul vezicular, din produsele de descuamare a leziunilor și mai rar (în primele 7 zile de boală) din sînge.

Diagnosticul diferențial este uneori destul de dificil. El trebuie făcut cu alte manifestări ale herpesului cutanat, cu varicela, variola, cu pio-

Scanned with OKEN Scanner

dermitele şi cu vaccina generalizată (127). În cazul eczemei vaccinale datele anamnestice în ceea ce priveşte inocularea individului sau contactul lui cu alte persoane vaccinate sînt de mare valoare în stabilirea diagnosticului.

3. HERPESUL TRAUMATIC (HERPES DE INOCULARE)

Se întîlneşte atît la copil cît şi la adult. La copil, o infecţie primară a tegumentelor poate fi favorizată de o leziune traumatică preexistentă (arsuri, zgîrieturi, deget supt) şi boala este cunoscută sub denumirea de herpes traumatic.

Scott şi colab. (175) semnalează însă apariţia unei infecţii herpetice primare după un traumatism fără soluţie de continuitate.

Unii adulţi, şi în special cei care lucrează în laborator sau îngrijesc bolnavi cu erupţii herpetice, fac o infecţie herpetică de inoculare numai dacă prezintă o leziune traumatică a tegumentului.

După o perioadă de incubaţie de 2 — 3 zile, pe o zonă eritematoasă, apare leziunea veziculară caracteristică, însoţită de febră şi adenopatie.

În cazul unui herpes traumatic al unei extremităţi, apariţia veziculelor are uneori mers centripet urmînd traiectul vaselor limfatice cu prinderea ganglionilor regionali.

În general, după 10 — 20 de zile leziunile herpetice de inoculare dispar şi boala se vindecă.

Herpesul de inoculare poate lua uşor aspectul unui panariţiu, greu de diferenţiat de panariţiul microbian.

Apariţia recidivelor în cazul infecţiilor herpetice de laborator au fost semnalate de către Siegert (180).

B. INFECŢII HERPETICE ALE MUCOASELOR

1. GINGIVO-STOMATITA HERPETICĂ

Este cunoscută sub diverse denumiri (stomatită aftoasă, stomatită Mikulicz, stomatită Vincent, stomatită ulceroasă sau gingivo-stomatita infecţioasă acută) şi considerată ca cea mai frecventă manifestare a infecţiei herpetice la copil (49) (81) (38) (41) (20) (171) (34).

Dodd şi colab. (49) au fost autorii care au demonstrat că virusul herpetic poate fi izolat cu regularitate din leziunile de stomatită ale copiilor mici.

Boala apare atît sub forma unei infecţii primare, cît şi sub formă recidivantă.

Prima formă, care uneori are aspectul unei infecţii severe atît prin simptomatologia generală cît şi prin cea locală, se întîlneşte cel mai frec-

Scanned with OKEN Scanner

vent la copilul mic (1 — 3 ani) și în special la cei subnutriți (88). Este de altfel demonstrat faptul că anticorpii herpetici de origine maternă apar la nou-născut și persistă pînă în luna a 6-a, vîrstă după care copilul devine susceptibil față de virusul herpetic, el putînd face o infecție primară inaparentă (în aproximativ 90% din cazuri) sau o gingivo-stomatită acută (în 10% din cazuri).

Infecția primară poate apărea însă și la copilul mai mare și chiar la adult (165). S-au semnalat însă și izbucniri familiale de stomatită herpetică primară, apărută în urma contactului cu un individ cu leziuni herpetice (12).

Debutul bolii apare după o perioadă de incubație de 3 — 7 zile și se caracterizează prin cîteva simptome prodromale, de cele mai multe ori de mică intensitate, după care se instalează febra, congestia mucoasei bucale și hipersalivație; apar apoi leziunile veziculare localizate pe mucoasa bucală (gingii, obraji, limbă, cerul gurii). Uneori veziculele sînt localizate și pe buze, față și degete, sau chiar pe amigdale (angina herpetică). În cazuri mai severe sînt prezente și leziunile veziculare cutanate care au același aspect și evoluție cu leziunile bucale.

Veziculele, variate ca număr și mărime, se deschid prin macerare rapidă și leziunea ia aspectul unor ulcere (plăci galben-cenușii strălucitoare formate prin confluarea mai multor vezicule sparte și acoperite cu un depozit celular), foarte dureroase, însoțite de foetor bucal și adenopatie submaxilară sau cervicală (în cazul anginei herpetice) foarte dureroase la palpare. În această fază de evoluție a leziunii, din cauza durerilor, copilul refuză să se alimenteze, slăbește și ajunge într-o stare fiziologică mizeră.

Boala durează 10 — 14 zile, după care durerile dispar și erupția se vindecă în general fără să lase vreo cicatrice; adenopatia regională persistă o perioadă mai lungă de timp.

Atingerile viscerale sînt în general absente. Totuși în cazuri severe de gingivo-stomatită herpetică primară, au fost notate atingeri hepatice (195).

În cazul infecției generalizate, observată în special la subnutriți (88), letalitatea este destul de mare (27%).

Cu excepția acestei forme, prognosticul gingivo-stomatitei herpetice este în general favorabil.

După boală anticorpii apar în sînge, însă virusul nu dispare din celulele epiteliale. În anumite condiții, acest virus „biofit" devine din nou agresiv și determină cea de-a doua formă, stomatita recidivantă, identică din punct de vedere lezional cu stomatita primară.

Caracteristic acestei forme este prezența erupției localizate pe fața interioară a buzei și pe mucoasa gingivală alăturată, fenomenele generale fiind absente. Ea apare deci la indivizi care au făcut infecția primară și au anticorpi în sîngele lor.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările serologice întreprinse de Burnet şi colab. (37) (38) (39) (40) (41) au demonstrat că prezenţa anticorpilor herpetici este rareori întîlnită la copil, ea fiind legată de apariţia stomatitei herpetice.

Studiind 44 de copii cu gingivo-stomatită herpetică, Lelong, Simon-Lavoine, Dubois şi Samaile (116) găsesc la 33 dintre ei o creştere semnificativă a anticorpilor fixatori de complement.

Dodd şi Ruchman (50) şi Blank şi colab. (21) au considerat stomatita recidivantă şi ulceroasă ca nefiind de natură herpetică.

Cercetările lui Scott şi colab. (176), Van Rooyen şi Rhodes (198), Kilbourne şi Horsfall (106) au demonstrat însă că forma recidivantă a stomatitei este o infecţie herpetică.

Diagnosticul gingivo-stomatitei herpetice este uşor de stabilit prin izolarea virusului din spălătura nazo-faringiană, sînge sau chiar din fecale (36) (64) (85).

În cazul antingerilor amigdaliene sau a părţilor moi ale cavităţii bucale, se impune diagnosticul diferenţial cu herpangina determinată de virusurile Coxsackie din grupul A, cu faringita prin adenovirusuri şi cu amigdalita streptococică, greu de diferenţiat clinic. Diagnosticul diferenţial este mult mai uşor de făcut cu angina din cursul febrei aftoase, difteriei sau cu angina Vincent.

După o stomatită, evidenţierea unei creşteri în dinamică a anticorpilor seroneutralizanţi faţă de virusul herpetic stabileşte în mod cert diagnosticul de infecţie herpetică.

În cazul unei stomatite recidivante se impune însă un diagnostic diferenţial cu ulcerul recidivant al cavităţii bucale, boală cunoscută sub denumirea de afte sau „*Canke sores*". Deşi aceasta din urmă a fost considerată de diverşi autori ((106) etc.) ca o manifestare herpetică, cercetările de laborator întreprinse de Blank şi colab. (21) nu au putut stabili originea sa herpetică, aşa încît ea este încă neelucidată etiologic.

2. CHERATO-CONJUNCTIVITA HERPETICĂ

Este cunoscută şi sub denumirea de cheratită dendritică, herpes corneean sau cheratită herpetică. Astăzi ea reprezintă o problemă foarte importantă pentru oftalmologi, datorită pe de o parte frecvenţei ei, iar pe de altă parte problemelor terapeutice pe care le ridică forma în care sînt alterate straturile profunde.

Cherato-conjunctivita herpetică poate apărea la copil ca o manifestare a infecţiei primare sau, aşa cum se întîmplă de cele mai multe ori, la vîrstele mai mari sub formă recidivantă.

Infecţia primară corneeană este însă foarte rară şi atunci cînd apare este benignă. Ea poate fi asociată cu leziunile herpetice cutanate ale feţei sau cu erupţia generalizată a pielei, uneori fiind afectate şi organele şi în special sistemul nervos central.

Scanned with OKEN Scanner

Clinic, infecția corneeană se prezintă sub formă superficială (30), (151) și profundă (194).

Forma superficială apare în mod special la copil și adolescent ca o manifestare a infecției primare. Ea se poate manifesta ca o conjunctivită unilaterală cu edem palpebral, secreție sero-purulentă, vezicule sau chiar ulcere pe pleoape și adenopatie dureroasă preauriculară.

Deseori însă leziunea este localizată în regiunea descoperită a fantei palpebrale și este aproape totdeauna însoțită de fenomene subiective extrem de intense ca senzație de corp străin, fotofobie și dureri peri- sau supra-orbitare, dînd uneori impresia unei nevralgii oftalmice.

Cu timpul, veziculele se sparg, confluează, și lasă descoperită membrana Bowman, luînd aspect de ulcer dendritic, care după Duke-Elder (56), Neame (140), Hamilton (87), Scott (171) etc. reprezintă cea mai frecventă formă a cheratitei herpetice. După Gallardo (75) multe din ulcerele dendritice ale copilului și adolescentului sînt manifestări ale primo-infecției herpetice.

Ulcerul dendritic este unilateral și cel mai frecvent unic; în cazuri extrem de rare, și mai ales în formele recidivante, pot fi observate pe aceeași cornee 2 — 3 ulcere.

În cheratita dendritică, recidivantă, leziunea apare la intervale de săptămîni sau luni și se deosebește de cheratita dendritică primară atît prin absența conjunctivitei foliculare cît și prin tendința leziunii de a se adînci.

Leziunea corneeană primară se vindecă de cele mai multe ori spontan (în locul ulcerațiilor putînd persista o pată întunecată) sau progresează în dimensie, constituind ulcere de aspectul unei hărți geografice. El poate evolua în profunzime, atingînd și membrana Bowman.

Leziunea inițială sau cheratita veziculară are deseori un caracter fugace, așa încît poate trece neobservată. Datorită acestui caracter unii autori consideră că această fază veziculară nu ar exista, eroziunea apărînd deodată fără a mai trece prin această fază.

La cîteva săptămîni sau luni de la infecția oculară inițială pot apare leziuni metaherpetice care au aspectul unui ulcer geografic.

Forma profundă sau cheratita disciformă se deosebește de forma superficială prin aceea că bolnavul acuză un deficit vizual. Leziunea este interstițială și are aspectul unui disc central sau paracentral, bine delimitat, însă cu marginile puțin flu, restul corneei fiind de aspect normal. Hipoestezia corneeană, sau chiar anestezia totală, este uneori însoțită și de dureri nevralgice periorbitare.

Există și forme atipice ale cheratitei herpetice puse de clinicieni pe seama diverșilor factori (virulența tulpinii de virus, rezistența locală a corneei, prezența sau absența în sînge a anticorpilor antiherpetici, prezența sau absența unei infecții bacteriene secundare etc.).

Scanned with OKEN Scanner

Ca *forme atipice superficiale* s-au descris *cheratita punctată superficială* şi *ulcerul marginal herpetic.*

Prima din acestea reprezintă în general forma de herpes corneean a tinerilor, ce poate apare de multe ori ca o primo-infecţie herpetică. Ea se caracterizează prin prezenţa în zona descoperită a corneei a numeroase ulceraţii mici, superficiale (epiteliale) punctiforme. Leziunea este unilaterală şi poate fi însoţită de o conjunctivită foarte accentuată sau de erupţii veziculoase ale pleoapelor şi marginii ciliare. Ea este de aspect punctiform însă uneori se întinde luînd aspect stelar sau striat.

În general boala evoluează în cîteva zile spre vindecare.

Ulcerul marginal herpetic apare în special la indivizii tineri. Este denumit astfel datorită localizării leziunii şi se caracterizează printr-o eroziune superficială cu marginile neregulate şi decolabile, hipoestezie locală şi dureri nevralgice cu iradieri.

Evoluţia leziunii spre vindecare şi apariţia recidivelor i-au determinat pe unii autori să considere această leziune (care la adult are cu totul altă etiologie) de natură herpetică.

Forme atipice profunde. Uneori cheratita disciformă ocupă întreaga suprafaţă corneeană determinînd aşa-numita *cheratită interstiţială herpetică,* sau ea ocupă numai un teritoriu corneean de formă triunghiulară cu baza spre limb şi vîrful spre centrul corneean realizînd *cheratita segmentară.*

Unii autori descriu chiar existenţa unor leziuni veziculare în camera anterioară a ochiului şi le consideră de natură herpetică.

Diagnosticul cherato-conjunctivitei herpetice este în general uşor de stabilit, atît prin aspectul clinic al bolii (durerile, hipoestezia corneeană şi apariţia recidivelor) cît şi prin izolarea virusului.

Examenul hematologic are uneori importanţă în diagnosticul bolii. Guyon-Gellin (84) semnalează în sîngele bolnavilor cu leziuni herpetice corneene prezenţa unei neutropenii şi uneori a virocitelor. După autor, în unele cazuri există o scădere a numărului polinuclearelor (57%) însă cu o creştere a monocitelor sau, din contra, deşi polinuclearele sînt în număr crescut (67%) există o limfopenie (4%) cu o monocitoză ridicată (28%).

În diagnosticul diferenţial trebuie ţinut seama de existenţa cheratoconjunctivitei determinate de adenovirusuri (tipul 8) în care durerile sînt mult mai violente.

3. RINITA HERPETICĂ ACUTĂ

Mucoasa nazală poate fi sediul infecţiei herpetice primare. Leziunea se manifestă prin prezenţa de mici vezicule cu uşor eritem în jur, hipertrofia ganglionilor cervicali anteriori şi febră (167).

Scanned with OKEN Scanner

4. HERPESUL GENITAL

Apare la ambele sexe atît ca o manifestare a infecției herpetice primare cît și a celei recidivante.

Infecția primară afectează cel mai frecvent vîrsta copilăriei și este mai des întîlnită la fetițe sub forma unei vulvo-vaginite (60) (183) (111).

S-a descris chiar cervicita de natură herpetică (150) în care leziunile veziculare locale sau vulvo-vaginale fiind absente diagnosticul a fost posibil numai prin metode de laborator (izolarea virusului din secrețiile cervicale și identificarea lui) și examen anatomic al fragmentului biopsic (prezența de incluzii intranucleare).

La vîrstele mai avansate leziunile herpetice genitale sînt de cele mai multe ori recidivante.

După Slavin și colab. (183) vulvo-vaginita se caracterizează prin prezența veziculelor localizate pe mucoasa vaginului, a labiilor și regiunea cutanată din jur (față internă a coapselor, regiunea anală, șanțul interfesier și chiar regiunea fesieră), prin dureri locale, edem de aspect moale, hipertrofia ganglionilor inghinali și ușoară ascensiune febrilă.

Uneori leziunea herpetică este precedată de dureri nevralgice (herpesul nevralgic al lui Mauriac) care dispar o dată cu apariția eflorescenței.

Evoluția leziunii este identică cu cea din herpesul bucal; veziculele se acoperă rapid cu membrane galbene-cenușii și se vindecă în 1 — 2 săptămîni. Acest aspect poate fi modificat prin spargerea veziculelor și suprainfectarea lor cu germeni microbieni banali.

La bărbat infecția primară a organelor genitale este mai rar întîlnită decît la femeie. Leziunea veziculară, de dimensii foarte mici, este localizată pe gland, prepuț sau în șanțul balano-prepuțial și însoțită uneori de adenopatie inghinală uni- sau bilaterală.

Veziculele sînt discrete și la cea mai mică atingere se sparg și confluează ,dînd aspectul unei leziuni superficiale cu contur policiclic. Dacă nu se supraadaugă o infecție bacteriană secundară și nu se intervine cu diverse medicamente iritante, baza eroziunei rămîne suplă.

Uneori infecția îmbracă aspectul unei uretrite caracterizate prin secreție sero-purulentă, dureri și usturimi la micțiune, care dispar după 1 — 2 săptămîni de evoluție a bolii. Concomitent cu leziunea pot apărea hiperestezii cutanate localizate în special în membrele inferioare.

În herpesul genital examenul lichidului cefalorahidian evidențiază adesea o hiperleucocitoză cu ușoară creștere a albuminelor (163) (157).

Avit-Scott (8), Hruszek (98), Sharlit (179), Duxbury și Lawrence (57) consideră că infecția este contractată prin contact sexual.

Izolarea virusului din lichidul vezicular sau din secreția uretrală și punerea în evidență a creșterii titrului anticorpilor seroneutralizanți în perioada de convalescență a bolii, față de titrul scăzut în perioada de debut, sînt probe evidente ale unei infecții herpetice primare.

Scanned with OKEN Scanner

Leziunile recidivante sînt identice, din punctul de vedere al aspectului lor, cu cele din infecţia primară (183).

S-au menţionat şi cazuri la care leziunile genitale au apărut concomitent cu stomatita herpetică (181) (60). Blanc şi Caminopetros (22) au observat însă diferenţe între virusul herpetic genital şi cel febril. Ambele sînt transmisibile la iepure, însă cheratita produsă de virusul herpetic genital este mai puţin severă decît cea produsă de virusul herpetic febril. Aceleaşi rezultate au fost obţinute şi prin inocularea subdurală, fenomenele encefalitice fiind prezente şi constante la iepurii inoculaţi cu virusul herpetic febril; la iepurii inoculaţi cu virusul herpetic genital fenomenele encefalitice apar mult mai rar şi după o perioadă de incubare mult mai lungă.

Lipschütz (122) vorbeşte chiar de două virusuri distincte; autorul nu a putut obţine rezistenţa iepurelui infectat pe cornee cu virusul herpetic febril faţă de inocularea cu virus herpetic genital.

5. ULCER HERPETIC GASTRO-DUODENAL? (HERPESUL GASTRO-DUODENAL?)

Posibilitatea existenţei ulcerului gastro-duodenal de origine herpetică a fost pusă în 1948 de către Gonsalves (79). Cercetînd nervul vag obţinut de la bolnavi operaţi de ulcer gastro-duodenal, autorul constată prezenţa leziunilor herpetice în nerv, fapt care-l face să considere că boala ar putea fi o manifestare herpetică recidivantă.

În 1953, Palmer şi Reagan (152) reiau această problemă; ei întreprind cercetări de laborator asupra prezenţei virusului în nervul vag (cercetări făcute pe 8 bolnavi operaţi de ulcer gastro-duodenal) şi conchid, bazaţi pe rezultatele obţinute, că ideea etiologiei herpetice a ulcerului gastro-duodenal trebuie abandonată.

C. DETERMINĂRI NERVOASE ÎN INFECŢIA HERPETICĂ

Ravaut şi Darré (163) au fost autorii care, în 1904, au presupus că virusul herpetic are proprietăţi neurotrope. Această supoziţie a fost apoi dovedită în mod experimental de către Doerr şi Vöchting (51); aceşti autori au inoculat pe corneea scarificată la iepure lichid vezicular recoltat din herpesul labial şi corneean şi au constatat, pe lîngă leziunile corneene, instalarea unei encefalite mortale transmisibile în serie.

Cu timpul, numărul observaţiilor clinice privind determinările nervoase în cursul herpesului s-au înmulţit. S-a putut astfel stabili că în afara manifestărilor cutaneo-mucoase, virusul herpetic provoacă la om sindroame meningeale cu o evoluţie benignă, meningo-encefalite sau chiar encefalite cu prognostic în general sever.

Scanned with OKEN Scanner

1. MENINGITA HERPETICĂ

În 1923, Philibert (157) admite etiologia herpetică a meningitelor limfocitare, însoțite de herpes cutanat. După autor, sindromul meningeal precede adesea erupția herpetică cu cîteva ore sau zile, iar în lichid sînt prezente 15 — 700 celule /mmc, în majoritate limfocite.

Încă din 1877 Mauriac descrie *herpesul nevralgic* care se însoțește de algii radiculare, probabil expresie și a unui proces meningeal în cursul herpesului genital, uneori recidivant.

Hissard (94) aduce argumente în favoarea existenței meningitelor herpetice. Autorul inoculează pe corneea de iepure lichidul cefalorahidian recoltat de la un bolnav cu meningită limfocitară, fără leziuni herpetice cutaneo-mucoase anterioare sau concomitente și reproduce o cheratită urmată de encefalită. Aceleași rezultate au fost apoi obținute de Jambon, Chaptal și Labraque-Bordenave (100).

Un fapt de importanță crucială a fost însă adus de Armstrong (7). Autorul, inoculînd intracerebral la șoarece lichidul cefalorahidian recoltat de la un bolnav cu meningită limfocitară benignă, fără erupție cutanată, izolează un virus pe care-l identifică ca fiind herpetic și autentifică rolul său în etiologia acestui caz.

Afzelius-Alm (3) cercetînd, atît prin izolarea virusului cît și prin evidențierea titrului anticorpilor seroneutralizanți, etiologia herpetică într-o serie de meningite limfocitare acute, cu sau fără leziuni cutanate herpetice concomitente, ajunge la concluzia că în 20% din cazuri sindromul meningitic este determinat de virusul herpetic.

Datele obținute îl determină pe autor să grupeze manifestările nervoase ale herpesului în : meningite acute simple (hipercitoză importantă, predominant limfocitară în lichidul cefalorahidian) și meningo-encefalite (somnolență, obnubilare, afazie sau paralizii oculare) cu febră ridicată timp de cîteva zile după care scade în lisis, bolnavii vindecîndu-se fără sechele.

Ubicuitatea virusului herpetic în organismul uman a dus însă la unele dubii în ceea ce privește izolarea lui din lichidul cefalorahidian.

Pentru a afirma cu certitudine rolul virusului herpetic în determinismul unor meningite limfocitare, s-a stabilit de către toți autorii care s-au ocupat de această problemă că izolarea virusului din lichidul cefalorahidian al bolnavului și evidențierea unei creșteri a titrului anticorpilor neutralizanți față de virusul herpetic reprezintă criterii de diagnostic.

Dar deoarece în meningitele limfocitare aceste investigații de laborator nu sînt efectuate în mod sistematic, este destul de greu de a aprecia exact frecvența etiologiei herpetice în aceste sindroame.

Din datele din literatură, în afara celor aduse de Afzelius-Alm (3), forma meningitică a infecției herpetice ar constitui o raritate. Astfel,

Scanned with OKEN Scanner

pentru Rezza (164), frecvența atingerilor meningeale ar fi de 7%. Adair, Gauld și Smadel (2), făcînd o statistică pe 854 de cazuri de meningite limfocitare, găsesc virusul herpetic în 6 din cele 114 în care el a fost studiat. Sohier și Buissiere (185) și Bernheim și Sohier (16), cercetînd etiologia meningitelor limfocitare în regiunea lyoneză, nu constată o frecvență prea mare a virusului herpetic, el putînd fi izolat numai în unul din cele 242 de cazuri cercetate. Quersin-Thiry (160) studiază la Institutul Pasteur din Bruxelles 377 de cazuri de meningită limfocitară. Tentativele de izolare a virusului herpetic în mai mult de jumătate din ele au evidențiat prezența sa numai într-unul din cazuri.

Meningite herpetice s-au semnalat la toate vîrstele. Ele pot apărea în cursul herpesului genital (herpesul nevralgic al lui Mauriac), al herpesului recidivant sau chiar concomitent cu o infecție herpetică primară (61).

Clinic, meningita herpetică se caracterizează prin cefalee, redoarea cefii, somnolență și febră, așa încît din acest punct de vedere ea este greu diferențiată de restul meningitelor limfocitare, mai ales în cazurile la care erupția herpetică cutaneo-mucoasă este absentă (16).

Puncția lombară arată întotdeauna un lichid clar, cu 10 — 40 elemente/mmc (mai rar 100 — 500 elemente), predominant limfocite, fără prezența de albumină (61).

Cu toate că simptomatologia meningitei herpetice este identică cu aceea a meningitelor Armstrong, urliană și leptospirozică, clinic ea poate fi totuși oarecum deosebită de acestea din urmă prin durata mai lungă a perioadei febrile (în medie 13 zile în loc de 6 — 8 zile) și prin prezența unor fenomene cerebrale supraadăugate (somnolență, epilepsie).

Cazul de meningită acută recidivantă cu crize de epilepsie adus de Pette (156) demonstrează așadar existența unei componente encefalitice la procesul meningitic.

De cele mai multe ori meningita herpetică însoțește sau precede erupția herpetică cutaneo-mucoasă (61), alteori, însă, aceste leziuni cutaneo-mucoase lipsesc sau sînt foarte discrete, așa încît diagnosticul de certitudine în acest caz nu poate fi pus decît prin izolarea virusului și prin studiul în dinamică al anticorpilor seroneutralizanți.

Cu totul interesantă este observația adusă de Brihaye (31). Este vorba de un bolnav în vîrstă de 50 de ani care face o gingivită cu ulcerații ce se repetă. În decurs de 2 ani aceste fenomene s-au însoțit în două rînduri de un sindrom meningeal. Primul episod meningeal a fost însoțit și de un herpes peribucal și perinazal, cu febră (40°,2) și o pleiocitoză predominant limfocitară (58 elemente în ziua a 6-a, 112 în ziua a 8-a, 12 în ziua a 21-a și 2 în a 31-a zi de boală), cu o albuminorahie crescută (1,10 g $^0/_{00}$ în ziua a 2-a, 1,60 g $^0/_{00}$ în ziua a 8-a și 0,60 g $^0/_{00}$ în ziua a 31-a de boală). Evoluția acestui prim puseu a fost favorabilă, dar reflexele osteo-tendinoase la membrele inferioare au rămas abolite.

Scanned with OKEN Scanner

2. MENINGO-ENCEFALITA ȘI ENCEFALITA HERPETICĂ

Existența unei meningo-encefalite de origine herpetică a fost mult discutată. Dacă ea a fost acceptată inițial ca o realitate, a urmat apoi o perioadă de timp în care s-a manifestat un oarecare scepticism în ceea ce privește existența ei.

Datele de laborator au permis însă autorilor să reafirme realitatea meningo-encefalitelor umane produse de virusul herpetic. În acest sens, Cambier (42), Bernheim și Sohier (16) au demonstrat în mod indiscutabil etiologia herpetică în unele encefalite. După Ross și Stevenson (166) virusul herpetic este incriminat în 19,6% din cazurile de meningo-encefalită (31 de cazuri studiate) și în 0,6% din cazurile de meningită (230 de cazuri studiate).

Natural că virusul herpetic *simplex* fiind foarte răspîndit sub formă „biofită", inaparentă, face dificilă stabilirea determinismului său în unele sindroame meningo-encefalitice, atît la copil cît și la adult.

Dacă din punct de vedere clinic meningo-encefalitele herpetice sînt greu de diferențiat de celelalte meningo-encefalite, mai ales în cazurile în care leziunea cutanată lipsește, examenele de laborator au adus date de mare importanță în diagnostic. Izolarea virusului din lichidul cefalorahidian și creșterea titrului de anticorpi herpetici în perioada de convalescență a bolii stabilesc etiologia herpetică a sindromului meningo-encefalitic apărut fie la indivizi cu o stomatită, gingivită sau angină herpetică, fie la cei fără vreo leziune herpetică.

Uneori izolarea virusului din lichidul cefalorahidian sau din țesutul nervos nu este posibilă. Aceste encefalite, prin caracterul lor anatomic (leziuni necrotice, prezența de incluzii etc.), sînt considerate totuși de natură herpetică (90), fiind încadrate în grupul encefalitelor sporadice cu incluzii.

Copilul mic peste vîrsta de un an poate prezenta fenomene de meningo-encefalită herpetică; ea apare după o leziune herpetică cutaneo-mucoasă sau chiar în absența ei (44) (191) (31). La aceștia din urmă poate fi observată prezența unei leziuni herpetice peribucale la mamă, cu cîteva zile înaintea debutului clinic al encefalitei la copil, sau prezența unui herpes recidivant la una din persoanele din jur.

Din punct de vedere *clinic*, sindromul meningo-encefalitic, în care etiologia herpetică a fost stabilită în mod cert, se traduce prin febră, convulsii, hemiplegie sau afazie, o stare de torpoare cu confuzie mintală urmată de comă și sfîrșit letal în 2 — 8 zile de la debut (93). Obiectiv, sînt prezente redoarea cefei și modificările de reflexe osteo-tendinoase.

Genard-Costes Mariette (76) constată la cazurile verificate etiologic fenomene clinice caracterizate prin obnubilare, paralizii ale nervilor oculomotori comuni, facial și atingerea centrilor vasomotori.

Scanned with OKEN Scanner

În unele cazuri ca cele ale lui Cambier (42), Bernheim şi colab. (17) şi Thieffry şi colab. (191), evoluţia bolii este favorabilă, simptomele clinice şi aspectul electroencefalografic (alteraţii difuze de unde ample şi neregulate cu maximum în regiunile posterioare) regresînd treptat.

În cazul adus de Thieffry şi colab., deşi boala a avut o evoluţie supraacută cu febră, comă profundă, convulsii şi paralizie facială periferică stîngă, ea a regresat rapid în mod favorabil. Importanţa acestui caz constă şi în faptul că fenomenele encefalitice au apărut cu 11 zile înaintea apariţiei veziculelor herpetice cutaneo-mucoase, erupţia fiind deci tardivă faţă de sindromul neurologic.

Faptul că în antecedentele copilului nu a existat suspiciunea vreunei alte leziuni herpetice, iar în cursul bolii s-a înregistrat o creştere a titrului anticorpilor fixatori de complement, determină pe autori să considere acest caz ca un aspect particular şi major al primoinfecţiei herpetice la copilul de peste un an.

Lichidian, majoritatea cazurilor prezintă o pleiocitoză predominant limfocitară, cu o albuminorahie uşor crescută.

În cazurile sale, Genard-Costes Mariette evidenţiază 175 — 700 limfocite/mmc şi 0,46 — 1 g$^0/_{00}$ albumină în lichid.

Examen electroencefalografic. Evoluţia uneori favorabilă a bolii la copii de vîrstă mai mare a permis diverşilor autori de a studia aspectul electroencefalografic atît în faza acută cît şi în convalescenţă (17) (45) (191). După autorii mai sus-citaţi, sînt caracteristice alteraţiile difuze lente de unde ample şi neregulate cu maximul în regiunile posterioare, care se normalizează în cursul evoluţiei bolii, într-o perioadă mai scurtă sau mai lungă de timp. În cazul adus de Debré şi colab., poliritmia lentă cu unde delta, mai ales în regiunea posterioară, observată în primele zile, se normalizează în următoarele 7 zile de boală.

La adult encefalita herpetică diagnosticată virusologic şi anatomopatologic este destul de rară. Primul caz a fost descris de Zarafonetis şi colab. (202). De atunci, au fost descrise alte cazuri de encefalită herpetică la adult (208) (52) (7) (90) (31) (24) (178).

Manifestarea meningo-encefalitică a infecţiei herpetice primare este foarte frecvent precedată de o stomatită. Se pare însă că, la adult, primoinfecţia herpetică determină un număr mai mare de meningo-encefalite decît la copil, iar sechelele neuropsihice sînt mult mai frecvente la această vîrstă.

Perioada de invazie a bolii durează cîteva zile şi este caracterizată printr-o stare generală alterată, febră 39 — 40°, frisoane, cefalee, ameţeli, greţuri şi vărsături. Primul simptom al atingerii corticale este apariţia frecventă a crizelor jacksoniene sau a tulburărilor de vorbire. După cîteva zile se instalează tulburările de conştiinţă, ce merg pînă la comă, crizele

Scanned with OKEN Scanner

convulsive, hemiplegia și afazia ; simptomele clinice ale leziunii de trunchi cerebral sînt în general pe plan secundar.

Lichidian, se constată o hipercitoză predominant cu mononucleare și albumina moderat crescută (0,40 — 0,50 g‰, uneori chiar 1 g‰).

De cele mai multe ori boala evoluează grav ; apar tulburări de puls și respirație, iar bolnavul sfîrșește letal în 7 — 14 zile de la debutul clinic.

Dodge și Cure (47), Kurtzke (107) și Ross și Stevenson (166), aduc cazuri în care evoluția bolii a fost cu *restitutio ad integrum* sau cu sechele neurologice (hemipareză, hemianopsie, epilepsie sau afazie) și psihice (deficiență mintală, demență).

D. INFECȚIA HERPETICĂ NEONATALĂ

În ultimul timp infecțiile virotice contractate fie *in utero* de la mamă, fie în perioada perinatală au format obiectul a numeroase cercetări. Dintre acestea, o importanță deosebită a fost acordată infecției herpetice a nou-născutului.

Prima observație îi aparține lui Hass (89) ; el aduce cazul unui copil prematur care la 11 zile de la naștere moare cu hemoragii digestive ; autorul descrie boala după caracterul leziunilor observate (atingerea viscerală și în special hepato-suprarenală) sub denumirea de : „*hepatoadrenal necrosis with intranuclear inclusions bodies*".

Ulterior numeroși autori aduc contribuții importante la cunoașterea infecției herpetice neonatale (184) (209) (161) (204) (72) (73) (130) (59) (161) (211) (45) (121) (115) (137) (26) (44) (90) (78) (104) (212) (126) (19) (210) (113) (135) (131) (197) (15) (14).

Izolarea virusului din creier, ficat sau leziuni cutanate, aspectul necrotic al leziunilor din ficat, suprarenale și sistemul nervos central, evidențierea la mamă a leziunilor herpetice perineo-genitale înainte sau în momentul expulziei fătului și apariția la unii dintre acești copii a leziunilor herpetice cutaneo-mucoase sînt fapte care atestă fără îndoială existența infecției la această vîrstă.

Infecția este transmisă de la mamă transplacentar (134) sau în perioada postnatală. Erupția herpetică apare la mamă cu cîteva zile înainte sau chiar la naștere, fie sub forma unui herpes genital (209), și în acest caz infecția nou-născutului se face în momentul expulziei, fie sub forma unei stomatite herpetice, copilul putînd contracta foarte ușor boala herpetică ; căile prin care virusul pătrunde în organismul nou-născutului sînt cea sanguină și cea cutaneo-mucoasă.

Infecția herpetică neonatală poate fi diseminată (septicemică) sau meningo-encefalitică.

a. *Forma diseminată* este relativ mai frecvent întîlnită la copiii cu o greutate subnormală (210) și mai ales la cei născuți prematur (212). Se

manifestă în general ca o boală febrilă, însă în unele cazuri temperatura este sub normală.

Boala debutează de obicei 4 — 6 zile după naştere, cu febră şi leziuni herpetice localizate pe tegumente sau mucoase (stomatită, conjunctivită). Se semnalează însă faptul că leziunea herpetică este deseori foarte discretă, greu de pus în evidenţă, sau chiar lipseşte (204) (113). Uneori boala îmbracă din punct de vedere clinic aspectul unei ciroze hepatice (19), aşa încît diagnosticul de infecţie herpetică este stabilit numai prin examenul anatomopatologic care evidenţiază prezenţa focarelor de necroză în ficat şi suprarenale şi a incluziilor intranucleare.

Concomitent cu leziunea herpetică apare o alterare a stării generale, copilul refuză să mai primească alimentaţia, scade ponderal sub greutatea de la naştere şi face crize de cianoză. Caracteristic bolii este coloraţia icterică a tegumentelor şi mucoaselor (50% din cazuri) şi sindromul hemoragic (hemoragii cutanate, mucoase şi digestive) extrem de grav.

Clinic, ficatul şi splina sînt mai rar mărite de volum, însă din punct de vedere anatomopatologic leziunile în aceste organe sînt evidente şi caracteristice.

Frecvent întîlnite sînt însă manifestările pulmonare care deseori nu pot fi evidenţiate prin simptomatologia funcţională şi examenul clinic ci numai prin examenul radiologic. Prezenţa focarelor de opacitate, mai multă sau mai puţin intensă, demonstrează participarea pulmonară în această formă a infecţiei herpetice.

În unele cazuri predomină fie numai atingerea hepatică (113), fie atingerea hepatică şi cortico-suprarenală (197), fie atingerea hepatică şi encefalică (73), fie atingerea testiculară, pulmonară şi cardiacă (15).

În forma diseminată (septicemică) a infecţiei herpetice neonatale, în afara unei apatii şi somnolenţe, restul simptomelor neurologice sînt în general absente. S-a observat însă că la unele din cazurile la care au apărut fenomenele encefalitice, atît mama cît şi nou-născutul bolnav nu au prezentat vreo erupţie herpetică cutaneo-mucoasă (212).

Evoluţia infecţiei herpetice diseminate este în mod constant letală, fie în 5 — 15 zile sau chiar în 2 luni şi jumătate de la debutul simptomelor clinice de boală (Debré şi Mozziconacci).

b. *Forma meningo-encefalitică* a infecţiei herpetice neonatale este mult mai rar întîlnită. Boala apare la scurt timp de la apariţia leziunilor herpetice cutaneo-mucoase (peribucale, conjunctivale sau tegumentare). După Zuelzer şi Stulberg (204) debutul bolii poate varia de la cîteva zile pînă la 3 săptămîni sau chiar luni de la naştere. Boala se manifestă clinic prin febră, hipertonie musculară şi convulsii (210) (90) (212).

Lichidul cefalorahidian, de aspect xantocromic sau chiar hemoragic, prezintă o limfocitoză şi o creştere a proteinelor (90), (212). Rareori se observă fenomene de hipertensiune intracraniană.

Scanned with OKEN Scanner

Fără a avea deci o simptomatologie specifică, boala este extrem de gravă atît prin evoluția sa letală cît și prin sechelele neurologice.S-au semnalat însă cazuri de infecție herpetică neonatală cu fenomene meningo-encefalitice la care evoluția a fost favorabilă (112).

Diagnosticul de infecție herpetică neonatală este ușor stabilit în cazul în care leziunile herpetice cutaneo-mucoase sînt prezente. Lipsa lor îngreuiază însă diagnosticul clinic. În acest caz este necesar un diagnostic diferențial cu eritroblastoza, cu boala citomegalică, cu hepatita epidemică, cu listerioza și toxoplasmoza.

Leziunile viscerale caracterizate prin zone de necroză acidofilă de tipul coagulării, cu prezența de incluzii intranucleare în celulele situate la periferia focarului necrotic, sînt suficiente pentru a pune diagnosticul de infecție herpetică, chiar în absența investigațiilor virusologice.

Prezența în unele cazuri a unei corioretinite face dificil diagnosticul de herpes, leziunea fiind patognomonică în infecția toxoplasmozică. Totuși absența calcificărilor intracraniene și testul Sabin negativ exclud toxoplasmoza.

E. HERPESUL RECIDIVANT

În natură, virusul herpetic *simplex*, întîlnind organisme cu oarecare rezistență cîștigată își modifică proprietățile patogene și devine mai puțin agresiv.

În organismele cu reactivitate normală virusul astfel modificat nu mai are proprietatea de a se multiplica intens, organismul nu mai este forțat la o reacție puternică, salutară, cu distrugerea lui în țesuturile parazitate și germenele poate vegeta ani de zile în țesutul unde își găsește o relativă stare de echilibru biologic. Echilibrul între agresivitatea redusă a germenelui și rezistența țesutului parazitat face ca organismul să nu mai reacționeze, imunitatea antiherpetică să nu se mai producă, iar germenele ce supraviețuiește să se manifeste din timp în timp prin puseuri pasagere de erupții recidivante.

Această formă de maladie este constituită din apariția succesivă a erupțiilor herpetice *pe același teritoriu cutanat sau mucos*. În funcție de intervalele care separă două puseuri eruptive, Nicoalu, Portocală și Moțoc (149) disting două feluri de herpes recidivant ; *a*) un *herpes recidivant ritmic, sezonier*, ale cărui puseuri eruptive apar regulat o dată pe an, toamna (luna octombrie) sau primăvara (luna aprilie), sau chiar de două ori pe an (aprilie și octombrie) și al cărui ritm sezonier impresionează prin regularitatea sa, și *b*) un *herpes recidivant aritmic*, caracterizat prin recidive cu o cadență neregulată, la intervale variate mai mult sau mai puțin apropiate.

a) Cazurile incluse în prima din aceste două categorii de herpes recidivant sînt mai rare însă uneori sînt destul de grave în evoluția lor. Gravi-

tatea este în raport cu fenomenele nervoase cu alură progresivă care însoţesc boala (Nicolau şi colab.).

În herpesul recidivant ritmic sezonier (tipurile de herpes digital, fesier, facial) este incontestabilă considerarea influenţei sezoniere drept factor adjuvant. S-a putut preciza localizarea virusului, între două recidive în ganglionul spinal al regiunii tegumentare interesate (Nicolau şi colab.). Germenii vegetează în ganglionul nervos pînă în momentul cînd „cosmosul" intervine cu influenţele sale sezoniere încă nedefinite pentru noi. Sub aceaste influenţe se produce fie o scădere manifestă a rezistenţei terenului, fie o creştere bruscă a agresivităţii germenilor adormiţi, fie ambele fenomene deodată, toţi germenii mobilizîndu-se din ţesutul unde au vegetat. Datorită afinităţii lor pentru tegumente, ei coboară în lungul filetelor nervoase care conduc la teritoriul afectat în mod obişnuit de erupţie şi produc eflorescenţa recidivantă.

Astfel de cazuri au fost raportate de Dubreuilh (53), Nicolau şi Poincloux (145), Nicolau, Portocală şi Moţoc (149).

b) Există alte cazuri de herpes recidivant, constituite din erupţii ce apar la intervale variabile, cu o cadenţă neregulată şi al căror prototip este herpesul labial cu repetiţie şi herpesul genital; acesta este *herpesul recidivant aritmic.* Şi în această a doua categorie de herpes recidivant, participarea sistemului nervos în boala eruptivă este evidentă (clinica herpesului nevralgic al lui Mauriac (162), citologia lichidului cefalorahidian (163)).

Numeroşi autori au studiat cazuri de herpes genital recidivant aritmic: Flandin şi Tzanck (71), Nicolau şi Poincloux (146), Nicolau şi Banciu (144), Falchi (63), Flandin (70), Périn (155), Thomas (193), pentru a nu cita decît pe primii din cei ce s-au ocupat de această varietate de herpes recidivant.

Iată cîteva cazuri cu alte localizări decît în sfera genitală, autentificate prin inocularea pozitivă la animalul sensibil care este iepurele:

Herpesul recidivant labial (27) (96); *herpesul recidivant facial* (obraz, bărbie) (133) (54); *herpesul recidivant digital* (148) (82) (67); *herpesul recidivant fesier* (33) (158) etc.

În decursul anilor alte numeroase cazuri de herpes recidivant, inoculate sau nu la animalele de experienţă, au fost relatate de numeroşi autori.

La anumiţi indivizi, erupţia recidivantă este precedată sau însoţită de migrene, ceea ce a determinat pe Audry (9) să formuleze ipoteza herpetică în etiologia acestui sindrom algic.

1. HERPESUL RECIDIVANT EXPERIMENTAL

Numeroase experienţe au dovedit că oricare ar fi sediul sau aspectul manifestărilor herpetice, oricare ar fi cadenţa apariţiilor succesive ale procesului morbid, tulpinile de virus izolate din leziuni recidivante se

Scanned with OKEN Scanner

comportă la animalul de experiență în același mod ca și tulpinile de herpes idiopatic sau simptomatic (145) (147) (117) (142) (158).

În 1924 Nicolau și Banciu (144) obțin, prin heteroinocularea cu virus herpetic recidivant, reproducerea la om a unui herpes recidivant al brațului și atrag atenția asupra faptului deosebit de interesant că *inocularea herpesului recidivant la om determină leziuni herpetice recidivante*; acest fapt fusese observat de Lipschütz (122) la indivizii inoculați cu virusul herpetic genital recidivant, fără ca acesta însă să releve importanța lui.

Ulterior, descoperirea lui Nicolau și Banciu a fost confirmată de numeroși autori ca Falchi (63), Flandin (70), Hruszek (96) (97), Zurukzoglu (205) etc.

Recidivele consecutive inoculării experimentale a virusului sînt în legătură nu numai cu terenul, ci în primul rînd cu calitățile intrinsece ale virusului inoculat.

Herpesul recidivant conferit omului prin inocularea de material provenind din erupții recidivante se complică deseori cu tulburări nervoase mai mult sau mai puțin importante (63) (153).

Paulian (153) publică observația privind un individ inoculat la braț cu herpes recidivant și care, după mai multe recidive sezoniere, sucombă în urma unui herpes nevraxic evoluînd sub forma unei scleroze laterale amiotrofice, după mai mult de 7 ani de la inoculare.

Pentru a stabili dacă recidivele consecutive inoculării herpetice experimentale la om se datoresc numai terenului sau și calităților intrinsece ale virusului inoculat, Nicolau și colab. (143) încearcă să modifice, prin pasaje pe animale, calitățile virusului herpetic recidivant, adică să-l „derecidiveze".

Autorii efectuează aceste experiențe cu două tulpini de herpes recidivant. Cu una din tulpini, ce provenea dintr-un herpes digital recidivant aritmic, fac inoculări pe pielea scarificată a brațului la 4 oameni și obțin la doi dintre aceștia erupții locale recidivante. Același produs l-au inoculat concomitent și pe corneea scarificată la iepure, iar creierul unuia din acești iepuri, mort cu fenomene de encefalită herpetică, l-au folosit la trecerile intracerebrale la această specie animală.

După 5 pasaje intracerebrale în serie, suspensia de creier de iepure a fost inoculată pe pielea scarificată a brațului la alți 4 oameni. Trei din aceștia au făcut la locul de inoculare leziuni de herpes *simplex*, fără ca ei să prezinte, timp de peste un an de zile, cît au fost urmăriți, erupția de herpes recidivant.

Aceleași leziuni de herpes *simplex* le-au obținut în două pasaje cutanate la om, realizate cu lichidul recoltat din veziculele herpetice ale unuia din aceste cazuri umane cu inoculare pozitivă (fig. 78 *A*). Cu o a doua tulpină de virus herpetic recidivant s-au obținut rezultate identice (fig. 78 *B*).

Aceste date dovedesc că virusul herpetic recidivant, trecut în serie pe creierul de iepure, se transformă (după 5—6 pasaje) în herpes simplex.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatul conflictului dintre virus şi organism depinde aşadar nu numai de teren, ci mai ales de proprietăţile intrinsece ale virusului, de agresivitatea sa.

Germenele herpetic recidivant, puţin virulent, provoacă în prima fază a bolii numai leziuni locale. Datorită unei slabe reacţii a organismului,

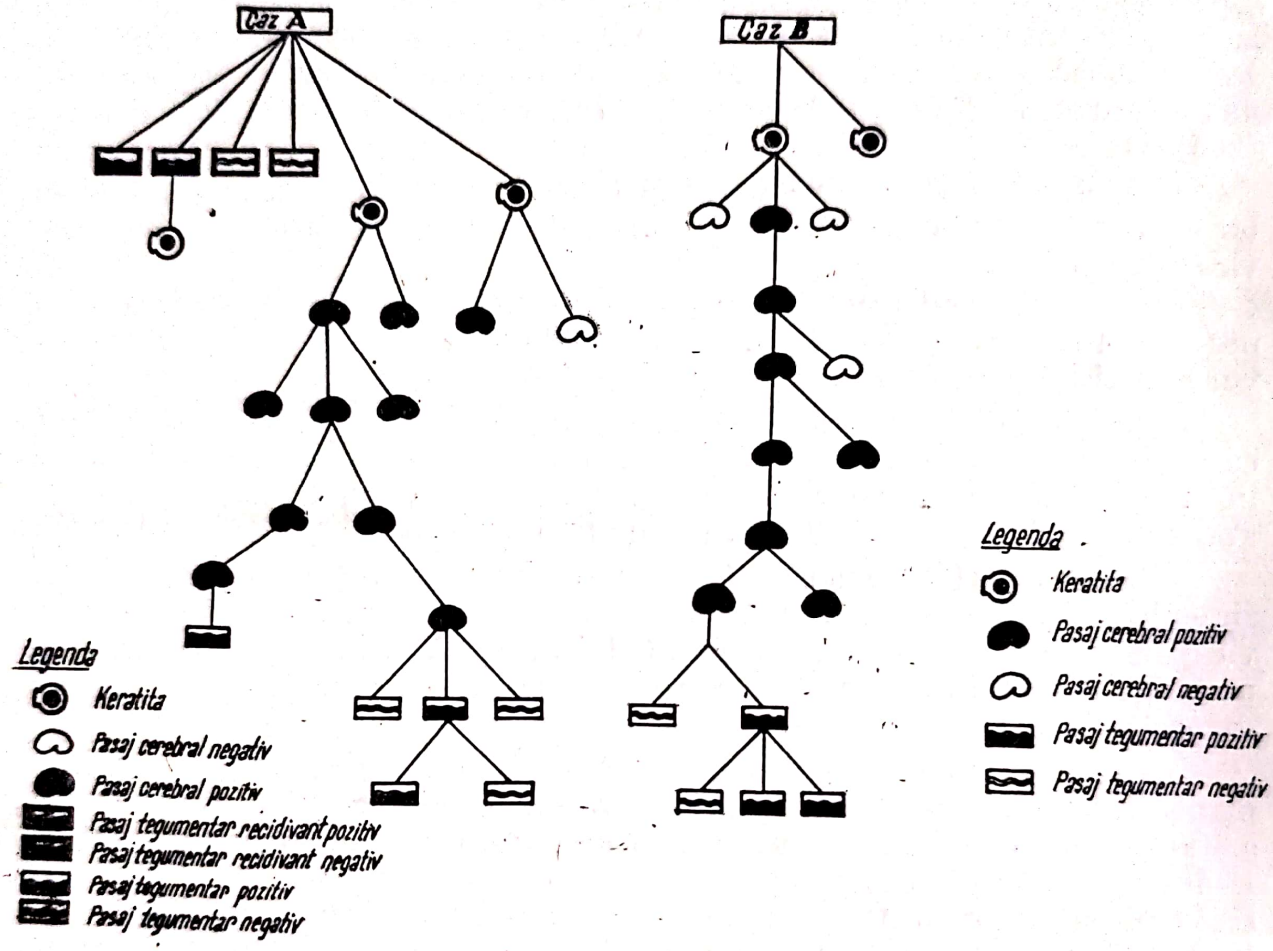


Fig.78. — Transformarea experimentală a virusului herpetic recidivant în virus herpetic *simplex*. Nicolau şi colab., 1956.

virusul nu este complet distrus *in situ* şi rămîne în organism sub formă de germene „biofit", lipsit de agresivitate, pînă în momentul cînd diverse cauze patogene adjuvante (umorale, hormonale, traumatice , cosmice etc.) determină fie scăderea rezistenţei organismului, fie exaltarea virulenţei virusului, cu apariţia erupţiei tegumentare caracteristice.

Prin trecerile repetate pe creierul de iepure, virusul herpetic recidivant, puţin virulent, devine mai agresiv. Inoculat pe pielea scarificată la om, determină în organismul acestuia o stare de rezistenţă incompatibilă cu persistenţa sa.

Scanned with OKEN Scanner

2. MECANISMUL APARIȚIEI RECIDIVELOR

Este greu de știut cărui factor i se datoresc recidivele la om, mai ales că Andrewes și Carmichael (6) și Burnet și Williams (41) au demonstrat că recidivele apar la persoane cu anticorpi prezenți în sînge și în titruri destul de ridicate.

Ellison, Carton și Rose (58) constată că la 18 din 26 de indivizi cu nevralgie trigeminală, tratată prin secționarea nervului, apar postoperator leziuni herpetice recidivante localizate în zona denervată. Investigațiile serologice efectuate de autori înaintea actului operator au demonstrat că toți pacienții aveau anticorpi herpetici (fig. 79) detectabili prin una sau ambele metode utilizate (seroneutralizare și fixare a complementului).

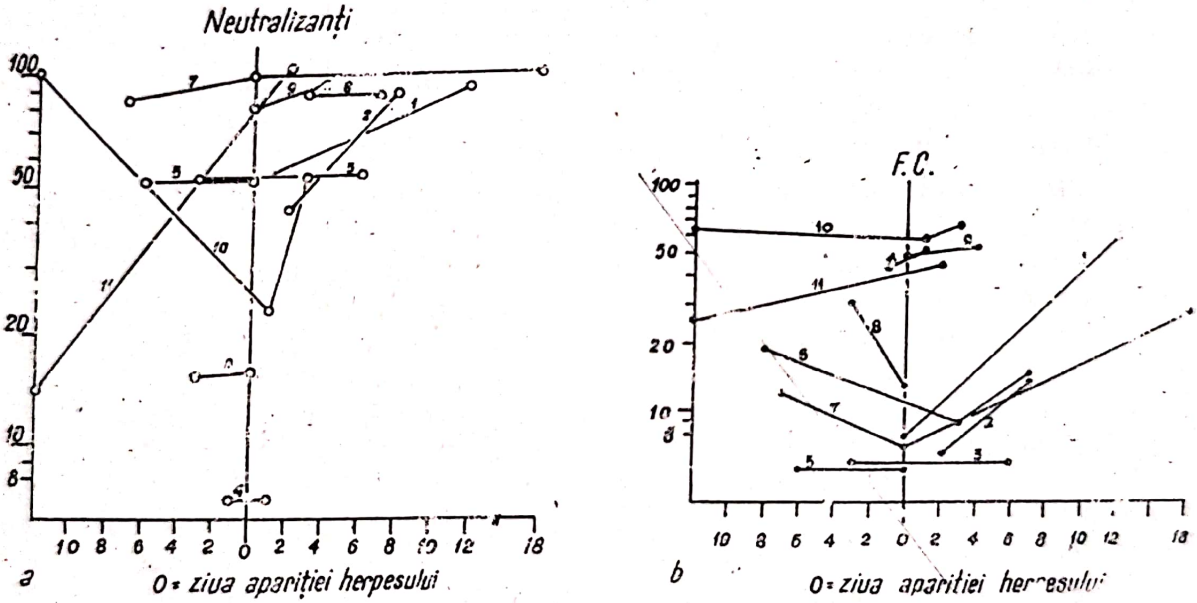


Fig.79. — Titrul anticorpilor serici la bolnavii care au prezentat herpes după secționarea nervului trigemen. În *a*, anticorpii neutralizanți, în *b*, anticorpi fixatori de complement. Ellison și colab., 1959.

Prezența anticorpilor în titruri destul de mari atît la persoanele care au făcut postoperator herpes recidivant cît și la cei care nu l-au făcut a îndreptățit pe autori să considere că nu există nici o corelație între titrul anticorpilor și apariția infecției herpetice recidivante.

Din rezultatele cercetărilor serologice efectuate, Söltz-Szöts (186) consideră că recidivele ar apărea datorită scăderii anticorpilor S, anticorpii V fiind prezenți în titruri ridicate. De altfel Söltz-Szöts (186) constată la animale că scăderea titrului anticorpilor S face să apară fenomenele clinice de boală în urma reinfecției cutanate cu virus herpetic.

În cercetările sale, Perdrau (154) observă că iepuri parțial imunizați fac o encefalită herpetică latentă.

Diverşi autori au căutat să stabilească o analogie între datele obţinute în herpesul experimental şi apariţia recidivelor în infecţia herpetică la om.

Astfel, Good şi Campbell (80), inoculînd intramuscular iepuri adulţi cu o cantitate mare de virus, reproduc la un număr din animalele infectate o encefalită letală, restul rămînînd indemne. Aceste din urmă animale, supuse după 1—3 luni de la infectare unei sensibilizări prin inoculări intravenoase de albuş de ou, fac în proporţie destul de mare (16/44) simptome caracteristice unei encefalite herpetice. Cu aceste experienţe autorii demonstrează aşadar că virusul herpetic existent sub formă latentă în organismul animalului poate să devie agresiv sub acţiunea şocului anafilactic.

Aceleaşi rezultate au fost obţinute şi de Anderson şi colab. (5). Autorii, sensibilizînd iepurii cu ser de cal după vindecarea cheratitei herpetice experimentale, obţin un fenomen Arthus la nivelul corneei. Încercînd pe celule renale de iepure să izoleze virusul herpetic din corneea unde a apărut fenomenul Arthus cît şi din corneea unde nu a apărut, autorii obţin rezultate pozitive în 7 din 19 tentative de izolare numai din corneea animalelor la care s-a produs fenomenul Arthus. Faptul a fost explicat de autori ca un fenomen de reactivare a virusului în aceste condiţii experimentale.

Schmidt şi Rasmussen (170) încearcă de asemenea, prin diverse mijloace chimice, de a exacerba encefalita herpetică latentă a iepurelui. Autorii folosesc în experienţele lor, Pyromenul (un derivat pirogen bacterian preparat din *Pseudomonas aeruginosa*), cortizonul, glutationul şi 4 compuşi adrenalinici. Cu primele trei din aceste substanţe, autorii nu obţin nici un rezultat în ceea ce priveşte exacerbarea infecţiei latente herpetice; 6 din cei 10 iepuri parţial imunizaţi, care nu au prezentat timp de 24—160 de zile simptome de encefalită după inocularea de probă intracerebrală, au făcut însă la 2 săptămîni de la administrarea intramusculară a compuşilor adrenalinici fenomene de encefalită herpetică letală, cu izolarea virusului din creier, fapt ce-i determină pe autori să considere că adrenalina ar avea un rol important în declanşarea unei recidive herpetice la om.

Cercetările lui Finkelstein şi colab. (66) au demonstrat însă că scăderea periodică a concentraţiei de properdină din ser are influenţă asupra apariţiei recidivelor herpetice.

Stroud (189), bazat pe rezultatele dozării steroizilor la un bolnav cu un sindrom nefrotic ce prezenta şi un herpes recidivant, consideră că steroizii au un rol important în declanşarea unei recidive herpetice, creşterea cantităţii lor fiind evidentă la cazul respectiv cu ocazia fiecărui puseu herpetic.

Apariţia recidivelor după o infecţie herpetică primară a fost pusă pe seama aceluiaşi virus preexistent în organism şi nicidecum a unei reinfecţii exogene. Deşi încercările lui Blank şi Ranke (23) de a izola virusul din fragmentele de piele, între două pusee herpetice eruptive, au rămas negative, se consideră că după vindecarea erupţiei herpetice din infecţia primară virusul persistă totuşi în organism.

Scanned with OKEN Scanner

Identitățile antigenice între tulpinile de virus herpetic izolate de la același bolnav în cursul diverselor recidive, sînt date care atestă că recidivele sînt produse de același virus existent în organism sub formă latentă, „biofită".

Din datele obținute în cursul infecțiilor de laborator s-a putut conchide că o reinfecție cu un alt virus herpetic exogen nu este posibilă datorită prezenței anticorpilor serici, decît atunci cînd doza de virus inoculată ar fi foarte mare.

Ipoteza emisă de Kohn (110), destul de plauzibilă, ar fi că între două recidive virusul ar persista sub formă de ADN infecțios asupra căruia anticorpii serici, chiar în titruri foarte ridicate, nu au nici o acțiune.

După Herriot și colab. (92) inhibarea nucleazelor celulare care blochează multiplicarea virusului din ADN, permite virusului să se sintetizeze din acest ADN, determinînd astfel apariția recidivei.

O nouă interpretare a herpesului recidivant a fost dată recent de Nicolau (141) care vede acest proces patologic particular în modul următor :

„În herpesul recidivant, *forma de persistență* a agentului patogen în organism timp de luni de zile (circa 6 luni în herpesul recidivant sezonier) și în general timp de ani îndelungați, ar fi cea de acid nucleic viral. Recidiva poate face să iasă din inerția sa acest element adormit în celula care, sub influența unor cauze adjuvante (sezon, traumatism, intoxicații, hormoni etc.) reîncepe să biosintetizeze forme „vegetative" de *virioni*, în plus de formele infravirale decapsidate. În ansamblul populației de elemente infecțioase, în sînul erupției herpetice recidivante, ar exista astfel *forme infravirale* (virusuri decapsidate, „virus defectiv") responsabile de perenitatea (recidivele) infecției, precum și forme virionale care provoacă vezicularea iar mai apoi imunizarea teritorială segmentară puțin durabilă".

„Transformarea formelor infravirale herpetice în virioni poate fi de altfel obținută și pe cale experimentală, prin cultivarea *in vivo* în medii de cultură deosebit de favorabile (creier de iepure, specie animală extrem de sensibilă care, în natură, contrar omului, nu este niciodată afectată de infecția herpetică). În acest fel, noi am transformat virusul herpetic recidivant în virus de herpes *simplex*. Este foarte posibil că acidul nucleic „autonomizat" agent al herpesului recidivant, necapsidat în condițiile experimentale menționate, restaurat astfel, a redevenit virion complet (imunogen), agent patogen al herpesului *simplex*".

BIBLIOGRAFIE

1. Achard, C. — Rev. gén. Clin. Thérap., 1932, *46*, 689.
2. Adair, C. V., Gauld, R. L., Smadel, J. E. — Ann. Inst. Med., 1953, *39*, 675.
3. Afzelius — Alm, L. — Acta med. scand., 1951, *140*, suppl., 263, 1.
4. Anderson, S. G., Hammilton, J. — Med. J. Austr., 1949, *1*, 308.
5. Anderson, W. A., Margruder, B., Kilbourne, E. D. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1961, *107*, 628.

6. Andrewes, C. H., Carmichael, E. A. — Lancet, 1930, *1*, 857.
7. Armstrong, C. — Publ. Hlth. Rep. Wash., 1953, *5*, 16.
8. Avit-Scott, J. — Lancet, 1931, *1*, 972.
9. Audry, Ch. — Bull. Soc. franç, Derm. Syph., 1932, *39*, 738.
10. Baker, W. H., Lawton, A. M., McCarthy, K. — Brit. med. J., 1952, *2*, 1334.
11. Barker, L. P., Hallinger, E. S. — J.A.M.A., 1947, *135*, 149.
12. Bastin, R., Verliac, F., Tournier, P., Laufer, J., Col, C. — Arch. franç. Pédiat., 1960, *17*, 1226.
13. Becker, W. B. — Sth. afr. J. Lab. clin. Med., 1966, *40*, 109.
14. Becker, W. B., Naudé, W. du T., Kipps, A., McKenzie, D. — Sth. afr. med. J., 1963, *37*, 74.
15. Bernard, R., Payan, H., Tamalet, J., Audibert, G. — Sem. Hôp. Paris, 1961, *37*, 2653.
16. Bernheim, L., Sohier, R. — Rev. Lyon méd., 1954, *3*, 361.
17. Bernheim, L., Sohier, R., Lanternier, J. — Lyon Méd., 1954, *9*, 360.
18. Biegeleisen, Jr., Z. J., Scott, V. L. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1958, *97*, 411.
19. Bird, T., Gardner, P. S. — Brit. med. J., 1959, *14*, 993.
20. Black, W. C. — J. Pediat., 1942, *20*, 145.
21. Blank, H., Burgoon, C. F., Coriell, L. L., Scott, T. F. Mc N. — J. A. M.A., 1950, *142*, 125.
22. Blanc, G., Caminopetros, J. — Ann. Inst. Pasteur, 1924, *28*, 152.
23. Blank, H., Ranke, G. — Citat de Siegert R. în *Die Viruskrankheiten des Menschen*, Bieling R. şi Gsell O., Ed. 6, Johann Ambrosius Barth/Verlag, Leipzig, 1964.
24. Bloedhorn, A., Stammler, A., Ackermann, R., Scheid, W. — Dtsch. med. Wschr., 1962, *87*, 1247.
25. Boake, W. C., Dudgeon, J. A., Burnet, F. M. — Lancet, 1951, *1*, 383.
26. Bogaert, L. van — Rev. neurol., 1956, 6, 431.
27. Bouman, L., Bok, S. T. — Ned. T. Geneesk., 1925, 2406.
28. Brain, R. T., Dudgeon, J. A., Phillpott, M. G. — Brit. J. Dermat., 1950, *62*, 203.
29. Brain, R. T., Pugh, R.C.B., Dudgeon, J. A. — Arch. Dis. child., 1957, *32*, 102.
30. Braley, A. E. — Amer. J. Ophth., 1957, *43*, 105.
31. Brihaye, J. — Acta neurol. psychiat. belg., 1959, *11*, 1.
32. Bruna, F. — Boll. Ocul., 1954, *36*, 356.
33. Brungsgaard, E. — Derm. Wschr., 1930, *2*, 1183.
34. Buddingh, G. J. — Sth. med. J., 1946, *39*, 382.
35. Buddingh, G. J., Dodd K. — J. Pediat., 1944, *25*, 105.
36. Buddingh, G. J., Schrum, D. I., Lanier, J. C., Guindry, D. J. — Pediatrics, 1953, *11*, 595.
37. Burnet, F. M., — *Virus as Organism. Evolutionary and ecological aspects of some human virus diseases*, Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1945.
38. Burnet, F. M., Lush, D. — J. Path. Bact., 1939, *48*, 275.
39. Burnet, F. M., Lush, D., Jackson, A. V. — Austr. J. exp. Biol. med. Sci., 1939, *17*, 35.
40. Burnet, F. M., Lush, D. — Lancet, 1939, *1*, 629.
41. Burnet, F. M., Williams, S. W. — Med. J. Austr., 1939, *1*, 637.
42. Cambier, I. — Presse méd., 1955, *63*, 286.
43. Coetzee, N. J. — Sth. afr. J. Lab. clin. Med., 1955, *1*, 52.
44. Debré, R. — Algérie méd., 1958, *67*, 691.
45. Debré, R., Mozziconacci, P., Habib, R., Gautier, M., Rivron, E. — Arch. franç. Pédiat., 1955, *12*, 441.
46. De Lavergne, V., Kissel, P., Simonin, J. — Bull. Mém. Méd. Hôp. Paris, 1934, *58*, 200.
47. Dodge, P. R., Cure, C. W. — New Engl. J. Med., 1956, *255*, 849.
48. De Morsier, G. — Presse méd., 1938, *88*.
49. Dodd, K., Johnston, L. M., Buddingh, G. J. — J. Pediat., 1938, *12*, 95.
50. Dodd, K., Ruchman, I. — Pediatrics, 1950, *5*, 883.
51. Doerr, R., Vöchting, R. — Rev. gén. Ophthal., 1920, *34*, 409.
52. Draheim, J. H., Rodaniche, E. De — Amer. J. Clin. Path., 1952, *22*, 1077.
53. Dubreuilh, M. — Bull. Soc. franç. Derm. Syph., 1900, *11*, 169.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 4

ANATOMIE PATOLOGICĂ

A. LEZIUNI ÎN INFECȚIA EXPERIMENTALĂ

La iepure, leziunile cutanate experimentale au fost studiate de numeroşi autori. Ele sînt, din punct de vedere histologic, comparabile cu leziunile herpetice tegumentare ale omului, şi cu acelea provocate prin inocularea neurovaccinei pe piele la iepure.

Urmărită în evoluţie, aşa cum au arătat Levaditi, Harvier şi Nicolau (46), leziunea se caracterizează mai întîi prin apariţia unei diapedeze polinucleare, urmată de o proliferare a epiteliului, ambele fiind consecinţa epilării. Virusul se multiplică, iar celulele epiteliului malpighian şi foliculilor piloşi suferă modificări asemănătoare celulelor epiteliului corneean din cheratita herpetică experimentală.

Cheratita herpetică experimentală a iepurelui a făcut obiectul a numeroase lucrări ((33) (55) (25) (8) (46) (60) (29) (14) (28) etc.).

Virusul herpetic *simplex* inoculat pe corneea de iepure scarificată în prealabil determină apariţia unei cheratite interstiţiale caracteristice. Ea debutează cu alterarea epiteliului corneean care, într-o primă fază prezintă o vacuolizare citoplasmică şi leziuni de „degenerescenţă balonată oxicromatică a lui Unna" (58) (59) (46). Aceste modificări nucleare sînt în realitate aspecte ale cultivării intranucleare a germenilor herpetici (68) (73), care constituie colonii ce pot invada întreg nucleul. Celulele epiteliale intră într-o fază de proliferare amitotică intensă şi se constată prezenţa celulelor gigante (58) rezultate din această multiplicare rapidă (pseudo-celulă gigantă, după Portocală) (73); fiecare element gigant este constituit din mai multe celule epiteliale tinere, complete, fiecare din ele avînd nucleul înconjurat de o citoplasmă mai mult sau mai puţin abundentă. Nucleii acestor celule tinere sînt deseori invadaţi de inframicrobi, care se multiplică excesiv.

Într-o fază mai înaintată, epiteliul se descuamează, în special în centrul corneei, fiind disociat de către polinuclearele de infiltraţie care încep să pătrundă şi în straturile mai profunde, între lamelele corneene. Pe suprafaţa corneeană lipsită de epiteliu iau naştere veritabile microabcese bacteriene formate din leucocite al căror nucleu este redus la stadiul unui sîmbure cromatic mai mult sau mai puţin deformat. La nivelul limbului corneean această inflamaţie acută cu polinucleare este înlocuită de o reacţie cu elemente mononucleare pigmentofore. În acest stadiu şi pe măsură ce infiltraţia între lamele corneene se măreşte şi polinuclearele intră în picnoză,

Scanned with OKEN Scanner

corneea văzută cu ochiul liber are un aspect lactescent, opac, datorit procesului de cheratită interstiţială. În fazele şi mai avansate, polinuclearele de infiltraţie sînt înlocuite în mare parte cu mononucleare (limfocite, macrofage). În camera anterioară a ochiului se poate găsi un exsudat format din polinucleare şi mononucleare mari.

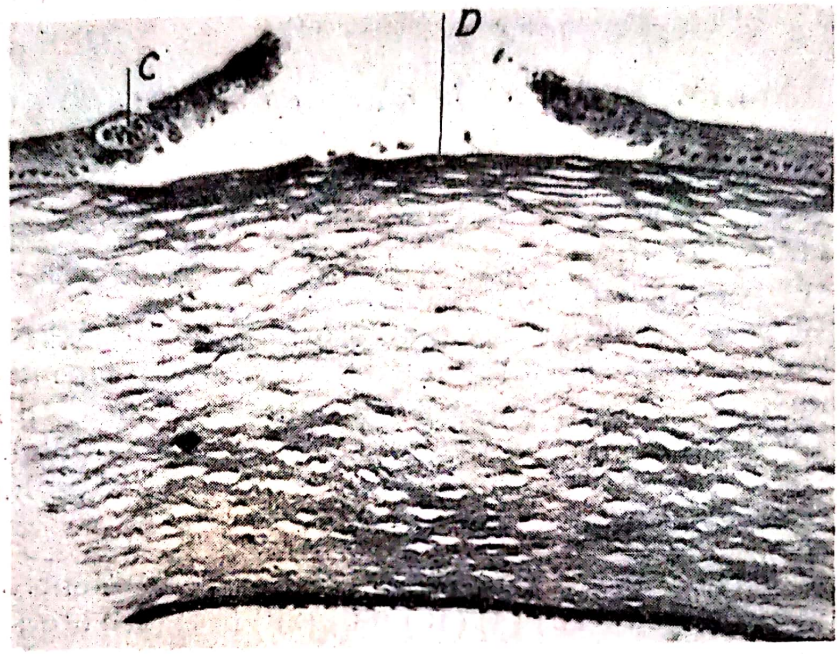


Fig.80. — Cheratită herpetică experimentală la iepure, 48 de ore de la inocularea virusului. Eroziune de scarificare a stratului epitelial: în *C*, celulă gigantă cu mai mulţi nuclei; în *D*, suprafaţa descoperită a ţesutului propriu al corneei. Portocală, 1941.

Histogeneza leziunilor corneene. Portocală (73) studiază pe iepure histogeneza leziunilor corneene produse de virusul herpetic, folosind în cercetările sale un virus adaptat la nevraxul iepurelui şi unul epiteliotrop.

Autorul constată la 24 de ore după inoculare prezenţa leziunilor traumatice, hernierea pe alocuri a stratului epitelial în ţesutul propriu al corneei sub forma unui pivot epitelial şi o infiltraţie cu elemente polinucleare, inegal repartizată, a stratului propriu al corneei. Infiltraţia cu polinucleare predomină însă în limbul sclero-corneean.

Celulele epiteliale, chiar din pivoţi, au însă o integritate morfologică normală, cariokinezele fiind în număr foarte redus.

La 30 de ore, pivoţii se adîncesc şi uneori se ramifică, iar stratul epitelial păstrează aderenţa la stratul subiacent. La acest interval de timp nu se constată decît foarte rare celule cu germeni herpetici intranucleari şi foarte rare celule în cariokineză. În ţesutul corneean subepitelial apar discrete infiltraţii cu polinucleare, unele pe cale de picnoză. Infiltratul se

intensifică însă la nivelul pivoţilor. Ca şi în stadiul precedent, limbul sclerocorneean este foarte infiltrat.

La 46 de ore apar numeroşi pivoţi epiteliali, fără ca în nucleul celulelor să fie evidenţiate colonii de germeni herpetici. Membrana Bowman apare intactă ; ţesutul propriu corneean este intens infiltrat.

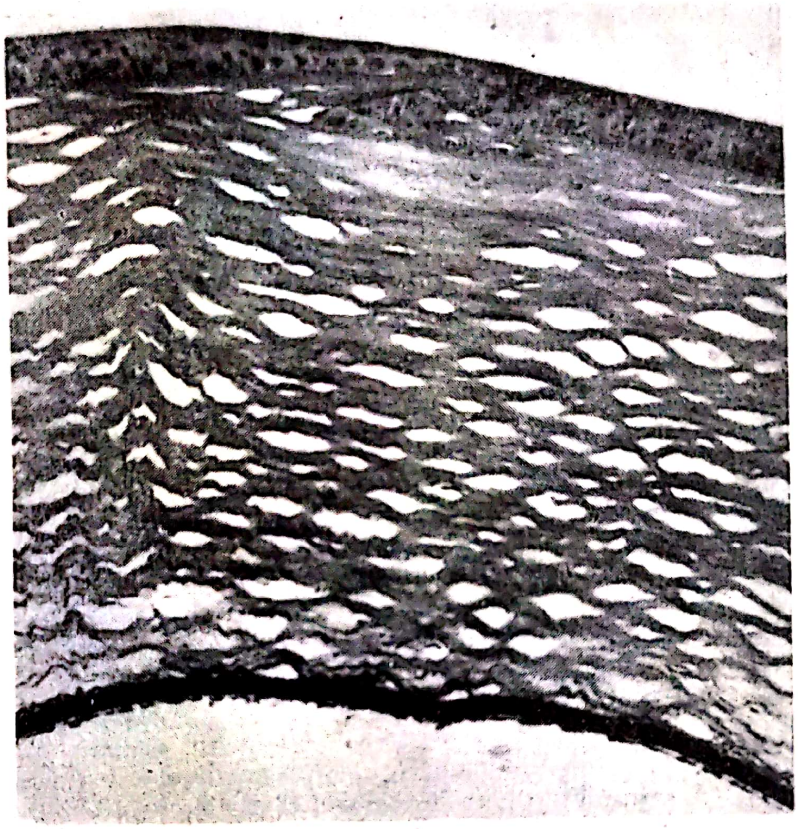


Fig.81. — Cheratită herpetică experimentală la iepure. Pivot ramificat constituit din celule epiteliale. Portocală, 1941.

La 48 de ore, leziunile sînt mai accentuate decît în stadiul precedent (fig. 80), celulele epiteliale apar disociate de polinucleare în picnoză. Uneori celulele bazale ale epiteliului irup în profunzime (fig. 81), la nivelul pivotului. În stratul celulelor epiteliale superficiale sînt prezente celule gigante. Între lamele corneene, mai ales în zonele de sub pivoţi, se constată infiltraţii cu celule polinucleare.

La 50 de ore, celulele pivotului epitelial prezintă uneori resturi de cromatină nucleară. Deseori membrana Bowman nu mai este respectată şi celulele bazale ale pivotului invadează în ţesutul propriu corneean.

Infiltratul format din elemente polinucleare, în mare parte degenerate, este mult mai accentuat în regiunea subiacentă pivoţilor (fig. 82). Prezenţa coloniilor de virus în celulele epiteliale este foarte rară.

La 52 de ore, este caracteristică prezența celulelor gigante în grosimea stratului epitelial, celule pe care autorul le considera mai degrabă ca fiind celule pseudo-gigante.

La 55 de ore se constată prezența de cordoane epiteliale, cu punct de plecare din pivot, care invadează parenchimul corneean.

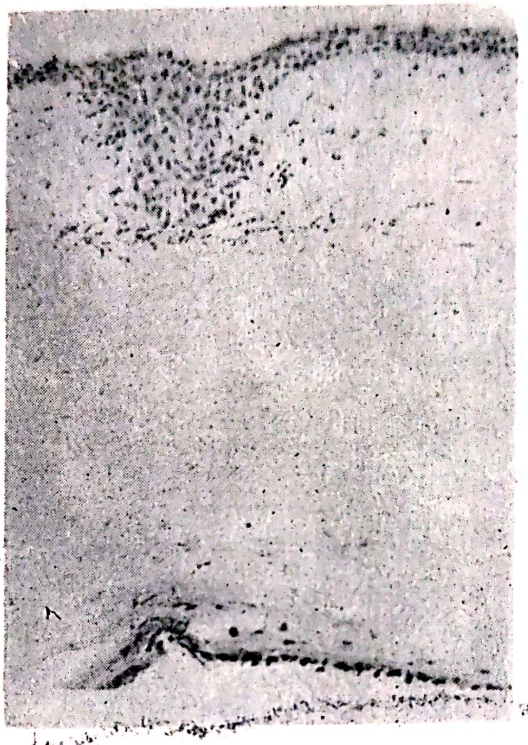


Fig.82. — Cheratită herpetică experimentală la iepure, 50 de ore de la inocularea virusului. Pivot de celule epiteliale. În apropierea stratului bazal a pivotului se constată prezența infiltratului cu polinucleare. Portocală, 1941 (microfotografie inedită).

Rareori în aceste prelungiri epiteliale se pot decela colonii de virus și incluzii tipice herpesului. În parenchimul corneean infiltrația cu polinucleare, în diverse stadii de degenerescență, se intensifică ; ea este mult mai accentuată în straturile superficiale, fiind aproape inexistentă în apropierea membranei Decemet.

La 70 de ore, celulele epiteliale sînt mult mai lezate ; în apropierea stratului bazal al pivotului celulele sînt disociate de procesul inflamator polinuclear. Între lamelele corneene infiltratul cu polinucleare pe cale de degenerescență este foarte accentuat, dînd aspectul unei cheratite interstițiale (fig. 83).

La 96 de ore, pivoții au în genere stratul bazal rupt, așa încît nu mai poate fi făcută o demarcație netă între epiteliu și țesutul propriu al corneei.

Epiteliul îngroşat şi descuamat mai ales în centrul corneei, prezintă pe alocuri celule gigante (fig. 84).

În acest stadiu de evoluţie a infecţiei, numărul celulelor în care sînt prezente coloniile de virus este mult mai mare.

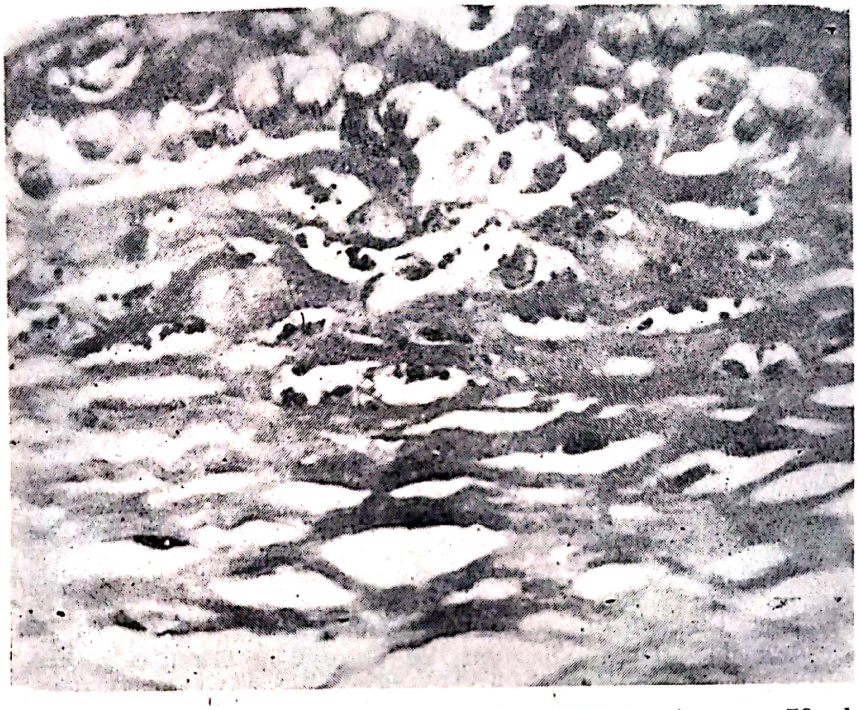


Fig. 83. — Cheratită herpetică experimentală la iepure, 70 de orede la inocularea virusului. Celulele stratului bazal a pivotului sînt disociate de infiltratul cu polinucleare. Acelaşi proces inflamator cu clemente polinucleare pe cale de degenerescenţă sînt prezente între lamelele corneene (cheratită interstiţială). Portocală, 1941.

Spre deosebire de virusul adaptat la nevrax şi care determină în cursul evoluţiei cheratitei leziunile amintite, autorul constată că virusul herpetic epiteliotrop induce mai rar formarea de pivoţi sau de cordoane epiteliale. Infiltraţia parenchimatoasă este secundară, cheratita începînd prin alteraţii ale epiteliului de acoperire.

Conjunctiva este sediul unei inflamaţii acute a submucoasei şi al alteraţiilor degenerative ale epiteliului adiacent.

Examenul microscopic evidenţiază în plus şi participarea *retinei*, *nervilor corneeni*, *nervilor ciliari* şi *nervului optic*, la procesul patologic.

Leziuni ale nevraxului. Oricare ar fi modul de pătrundere al virusului herpetic în organism, el ajunge pe calea nervoasă centripetă în nevrax, se multiplică şi produce alteraţii. Aceste alteraţii variază în funcţie de agresivitatea germenilor, de sensibilitatea animalului, de modul de inoculare,

de durata maladiei. Astfel se disting leziuni acute în care predomină elementele polinucleare şi leziuni mai mult sau mai puţin cronice, cu mononucleare. Histopatologia nevraxului iepurelui mort în urma bolii herpetice experimentale a fost studiată de numeroşi autori (9) (24) (25) (44) (46) (3)

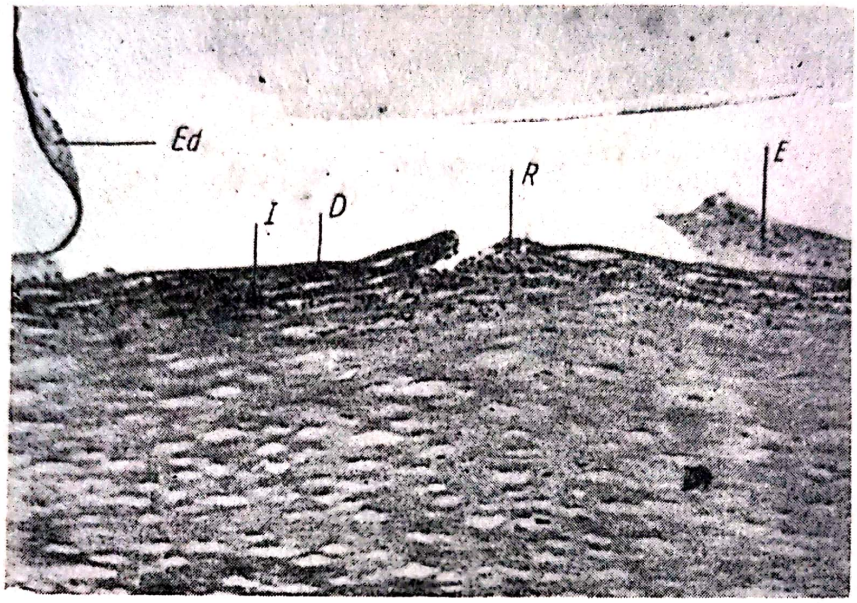


Fig.84. — Cheratită herpetică experimentală la iepure, 96 de ore de la inocularea virusului. Se observă o dezlipire a epiteliului pe porţiuni întinse (*E* şi *Ed*). În *R* leziune de scarificare cu proces inflamator plecat din straturile subiacente. În *D*, suprafaţa corneeană fără epiteliu. În *L*, ţesut propriu corneean. Infiltrat polinuclear în parenchimul corneean (I). Portocală, 1941.

(82) (18) (40) (61) (69) (30) (31) (36) (40 *a*) (26) (20) (71) (71 *a*) (65) (66) (73) (80) etc.

Meningele este puternic hiperemiat şi infiltrat. Leziunile inflamatorii sînt mai discrete în meningele convexităţii, intensitatea lor fiind mult mai mare în meningele de la nivelul bazei creierului (fig. 85), feţei ventrale a trunchiului cerebral şi feţei inferioare a lobilor temporali. Uneori, în cursul infecţiei experimentale la iepure, meningita bazală este singura leziune ce poate fi evidenţiată prin examenele microscopice (80). În general infiltraţia meningee este constituită din monocite, limfocite, celule plasmatice şi celule mononucleare mari; uneori elementele limfocitare predomină. În cazurile benigne sînt prezente polinuclearele.

În *parenchimul cortical* se observă infiltraţii difuze sau nodulare, procese de perivascularită (fig. 86), formate din aceleaşi elemente mononucleare (fig. 87) şi alteraţii ale neuronilor (fig. 88) (degenerescenţă oxicromatică). Leziunile maxime se găsesc la nivelul lobului piriform, în zona entorinală

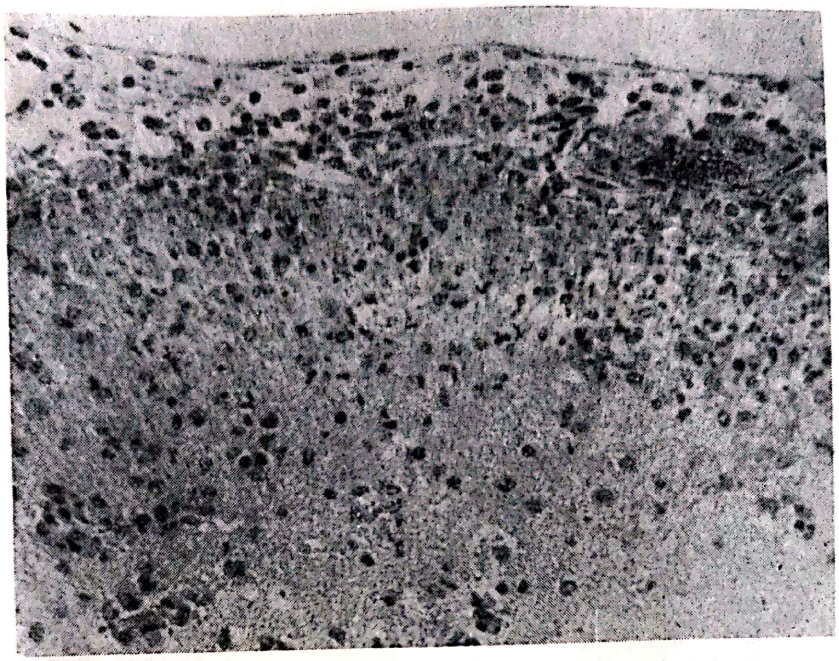


Fig.85. — Encefalită herpetică experimentală la iepure. Intens proces meningitic bazal și leziuni foarte accentuate în parenchimul cerebral. Portocală, 1941.

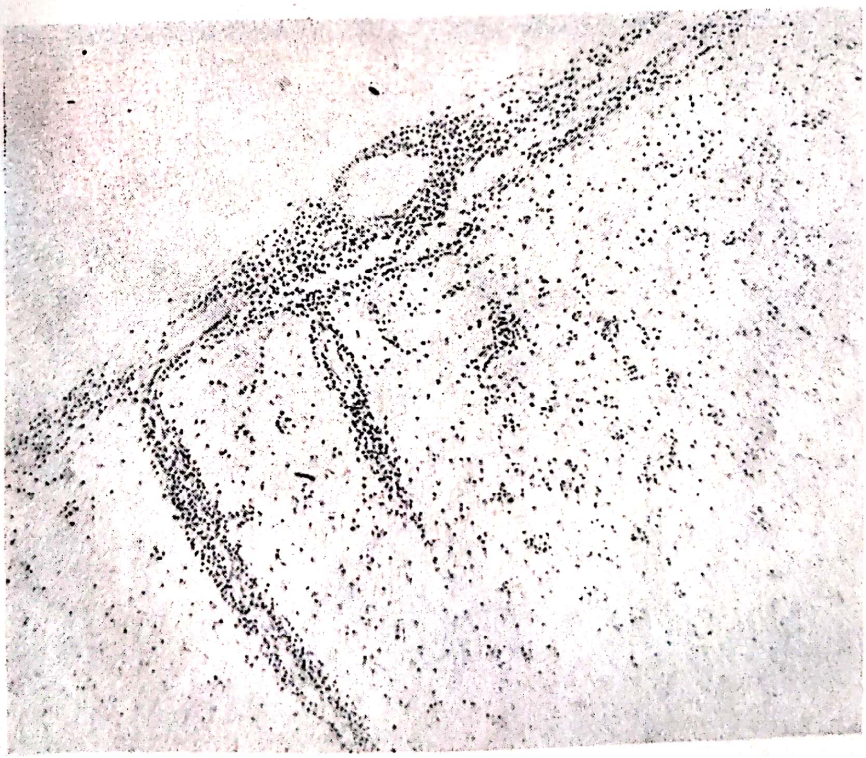


Fig.86. — Encefalită herpetică experimentală la iepure. Proces inflamator în meninge; perivascularite și infiltrații difuze în parenchimul cerebral.

Scanned with OKEN Scanner

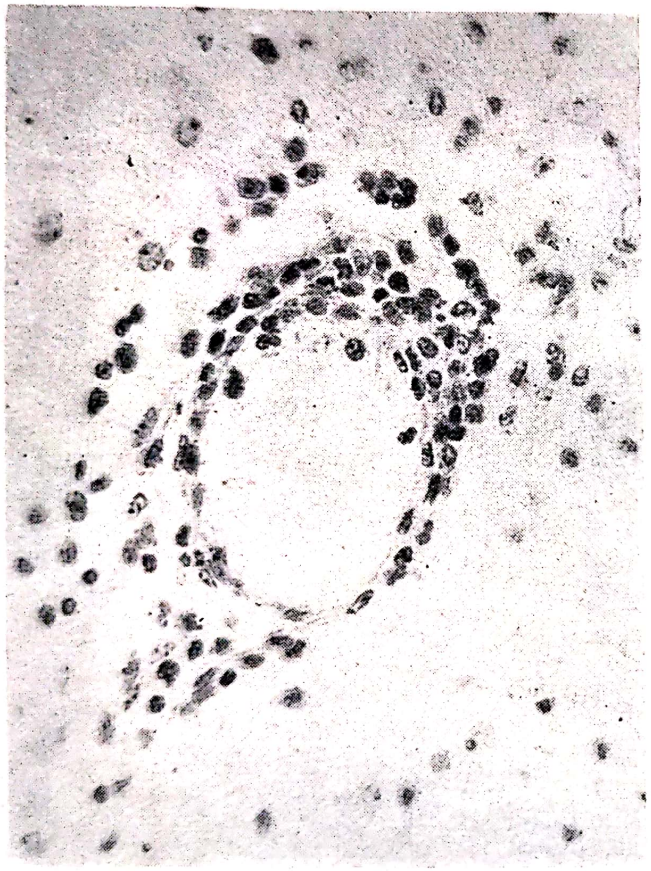


Fig.87. — Encefalită herpetică experimentală la iepure. Manșon perivascular în parenchimul cerebral.

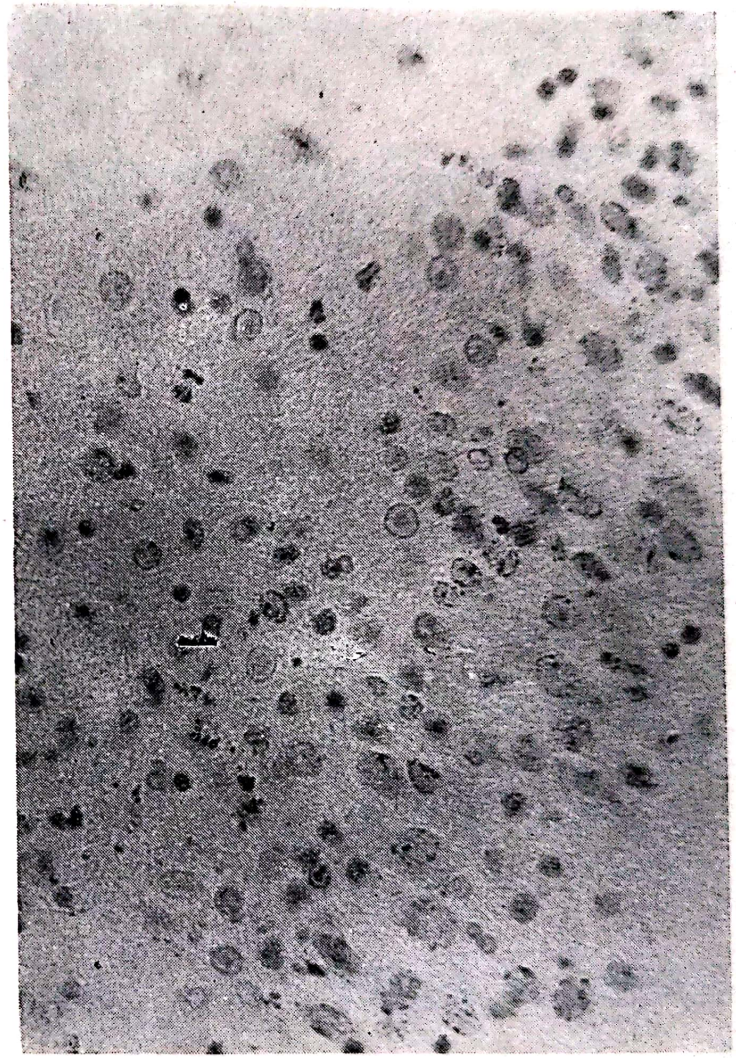


Fig.88. — Encefalită herpetică experimentală la iepure. Leziuni neuronale în zona electivă.

Scanned with OKEN Scanner

denumită de Levaditi, Harvier şi Nicolau (46) „zona electivă" ; la anumite animale, cornul lui Ammon prezintă aceleaşi modificări morfopatologice intense ca şi „zona electivă" (Nicolau).

Alteraţiile neuronilor, interpretate la începutul cercetărilor experimentale ale herpesului ca o degenerescenţă balonată oxicromatică a nuclei-

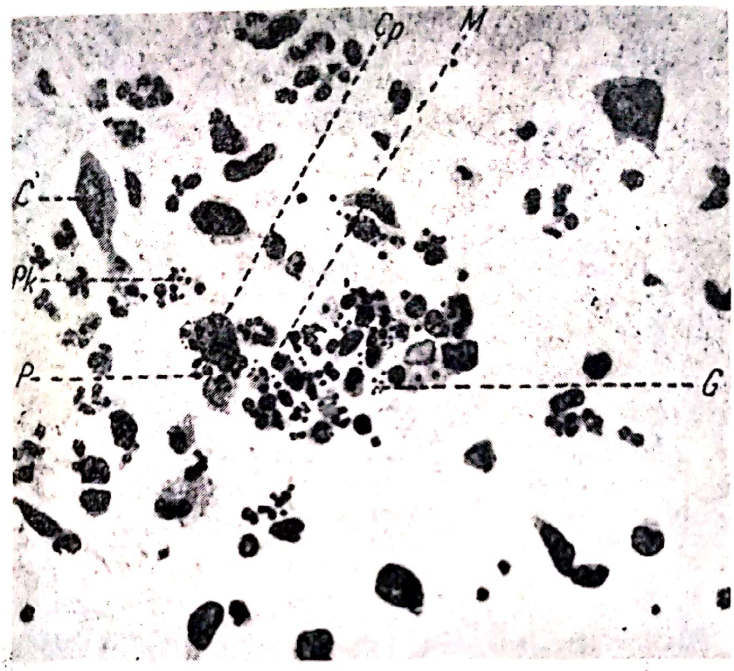


Fig.89. — Focar de encefalită herpetică acută în circumvoluţia hipocampului. Neuronofagie. În *C*, celulă nervoasă cu nucleul alterat ; în *Cp*, celulă nervoasă invadată de polinucleare ; în *P*, polinucleare ; în *Pk*, polinuclear cu nucleu în karioliză ; în *G*, granule cromatice provenite din karioliza unui polinuclear ; în *M*, mononuclear înglobînd două granule de cromatină.

lor, s-au dovedit ulterior mai complexe. Anumite celule nervoase parazitate de către inframicrobi degenerează complet, sînt invadate întîi cu polinucleare şi apoi înglobate în macrofage ; se asistă astfel la adevărate neuronofagii (fig. 89).

Alţi neuroni au nucleul mai mult sau mai puţin ocupat de elemente granulare corpusculare (fig. 90), dispuse sub formă de colonii inframicrobiene ; cromatina nucleară fragmentată este dispusă în blocuri neregulate în jurul membranei nucleare. În anumiţi nuclei, cromatina şi nucleolul dispar complet, pentru a fi înlocuiţi printr-o colonie de virus (fig. 91) din ce în ce mai invadantă. În fine, rareori, în unii neuroni se găsesc grupuri de germeni în citoplasmă (68).

Celulele gliale suferă şi ele modificări importante, datorită germenilor care le parazitează.

Prin metoda de colorare cu albastru de metil oxalatat şi fuxină acidă oxalatată descrisă de Nicolau şi Kopciowska (68) virusul corpuscular poate

Fig.90. — Encefalită herpetică experimentală la iepure. Incluzii intranucleare în neuronii cerebrali (zona electivă). Portocală, 1941.

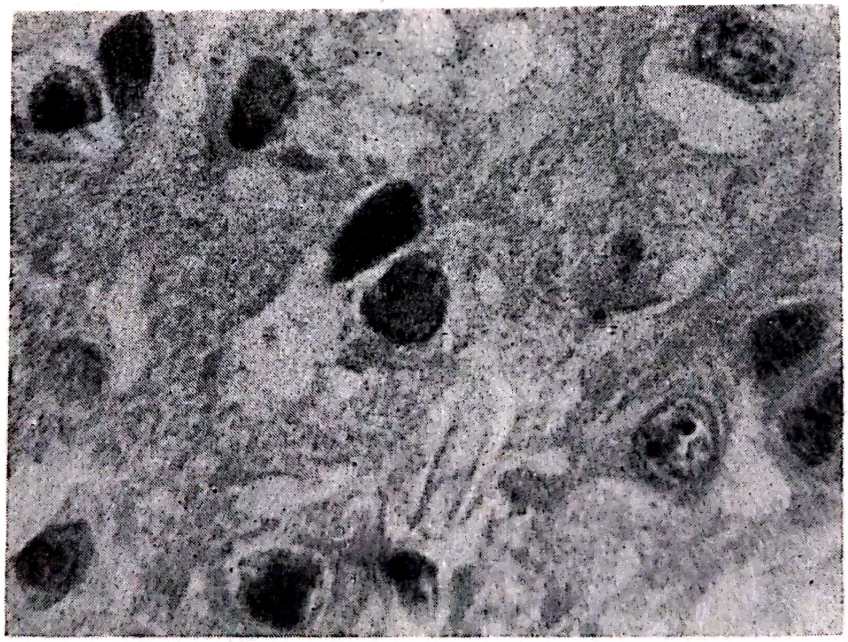


Fig.91. — Encefalită herpetică experimentală la iepure. Colonii de virus în nucleii neuronilor. Portocală, 1941.

fi pus în evidenţă în nucleul acestor ultime celule, precum şi în citoplasma unor rare celule endoteliale şi a unor celule monocitare de infiltraţie meningeană sau parenchimatoasă.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul în care encefalita herpetică a iepurelui se vindecă (oricare ar fi tost calea de inoculare), la sacrificarea unui animal în aparentă stare de sănătate, se pot găsi leziuni cerebrale cronice, distructive, cicatriceale, mai mult sau mai puţin intense şi mai mult sau mai puţin întinse, ajungînd uneori pînă la un aspect de porencefalie cavitară. În zonele de distrugere a parenchimului cerebral, unde neuronii au dispărut (zona electivă, cornul lui Ammon, scoarţa cerebrală) se găsesc celule mononucleare de infiltraţie, limfocite, celule epiteloide pline cu pigment, numeroase celule granulo-adipoase ale lui Rio-Hortega, derivate din microglie, noduli de infiltraţie care uneori pot înlocui neuronii degeneraţi distruşi, constituind nodulul neuronofagic. Aceste aspecte au fost evidenţiate prin cercetările lui Nicolau, Guiraud şi Kopciowska (67) în cazurile etichetate ca „neuroinfecţii autosterilizate nemortale" ale lui Levaditi, Sanchis-Bayarri şi Schoen (50) (51) şi Levaditi, Lépine şi Schoen (48) în cazurile de „neuroinfecţii autosterilizate mortale".

În *măduva* iepurilor infectaţi pe cale intracerebrală leziunile sînt discrete; la animalele paralizate în urma inoculării pe cale cutanată sau genitală ele sînt dimpotrivă comparabile din toate punctele de vedere cu leziunile cerebrale. Alteraţiile predomină în coarnele posterioare (fig. 92), cu o intensitate maximă în segmentul care corespunde teritoriului infectat (30) (31). În coarnele anterioare există de asemenea procese infiltrative (fig.93), însă mult mai reduse. Meningita cu mononucleare, manşoanele perivasculare şi focarele formate din elemente mononucleare sau polinucleare sînt aspecte lezionale caracteristice.

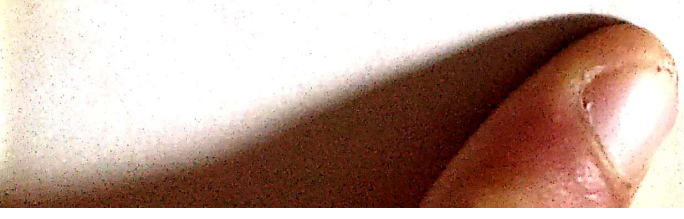
Leziunile interesează şi substanţa albă medulară. Boyes şi colab. (11) constată prezenţa de leziuni hemoragice localizate în special în regiunea dorsală a măduvei de aceeaşi parte cu inoculul, ele fiind de intensitate mai mică de partea opusă sau în regiunea ventrală.

În ganglionii spinali ai animalelor inoculate pe piele sau în sfera genitală, sînt prezente leziuni deseori intense. Se poate observa o infiltraţie interstiţială predominant mononucleară, hiperemie, perivascularite formate din elemente leucocitare, leziuni nucleare în neuroni, neuronofagii sau noduli postneuronofagici.

În *nervii periferici* se constată leziuni mai mult sau mai puţin intense de nevrită interstiţială descendentă (fig. 94), mai ales în porţiunea lor juxtaganglionară. Ele atestă fenomenul de septinevrită, adică de diseminarea centrifugă pe cale nervoasă a virusului cultivat în nevrax (65) (66). Modificările histologice ale trunchiului nervos inoculat direct cu virusul herpetic au fost studiate în special de către Levaditi şi Alberca-Lorente (43).

În *organele* iepurilor morţi de nevraxită herpetică, s-au constatat numai rareori leziuni în neuronii formaţiilor ganglionare intra-sau extrasplahnice şi în trunchiurile nervoase.

În mod practic nu există însă leziuni în organe.



Scanned with OKEN Scanner

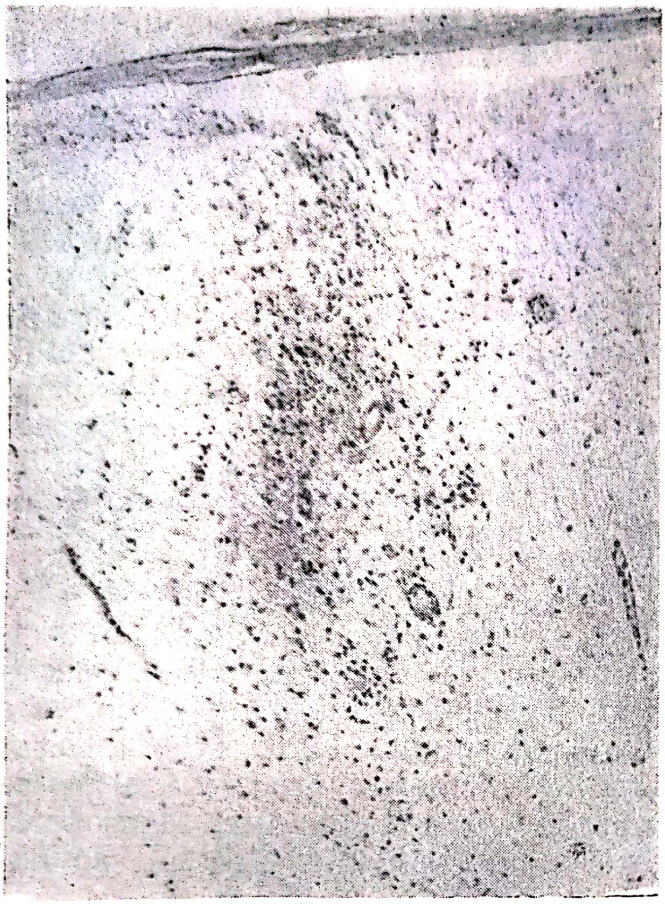


Fig.92. — Mielită herpetică experimentală la iepure, după inocularea virusului sub piele. Leziuni infiltrative în cornul posterior al măduvei de partea inoculată.

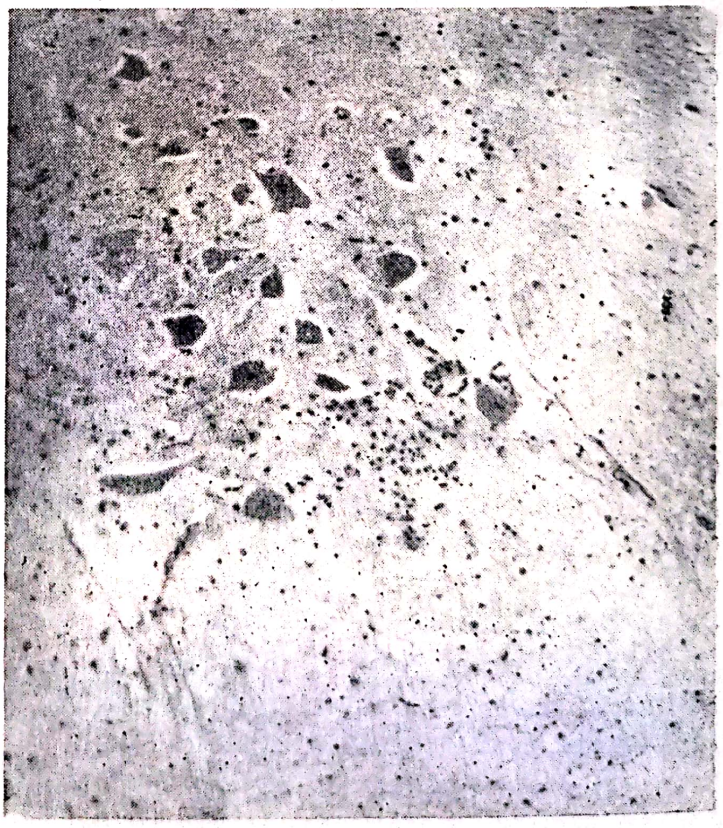


Fig.93. — Mielită herpetică experimentală la iepure, după inocularea virusului pe piele. Leziuni infiltrative în cornul anterior al măduvei.

Scanned with OKEN Scanner

La animalul infectat în capsula suprarenală, leziunile se caracterizează prin prezenţa de focare inflamatorii şi nodulare, difuze sau circumscrise, strict limitate în zona corticală. Aceste focare sînt constituite din necroza celulelor spongiocitare cu prezenţa la periferie a cîtorva elemente mononu-

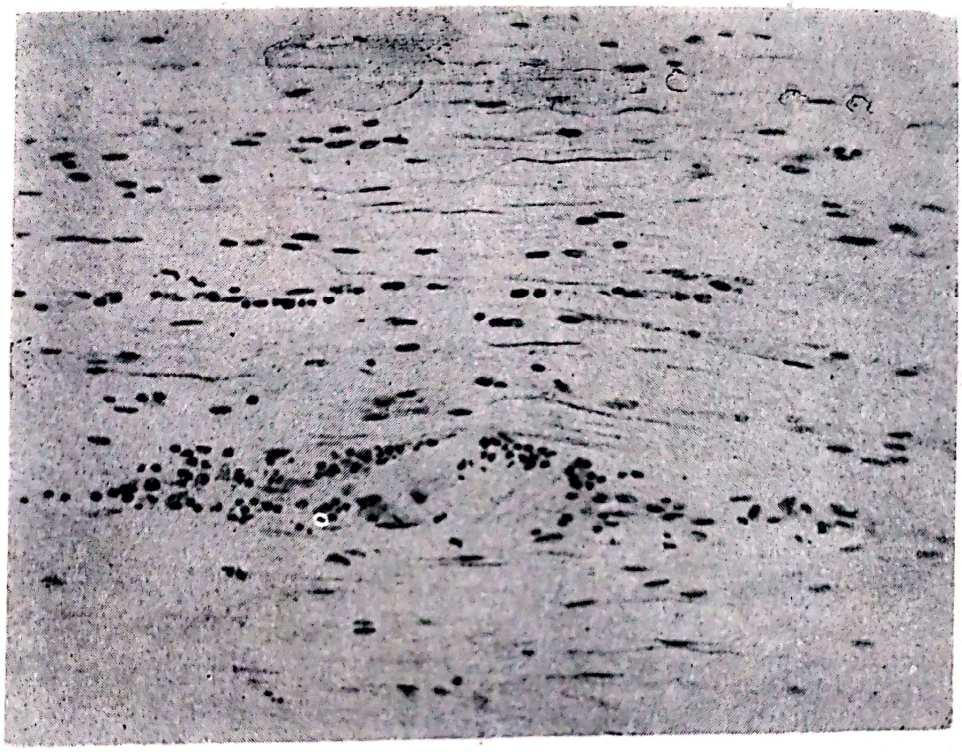


Fig.94. — Septinevrită herpetică sciatică la iepure, după inocularea virusului în creier. Perivascularite şi infiltraţii interstiţiale în nerv. Nicolau şi Dimăncescu-Nicolau, 1928.

cleare al căror nucleu se află în cariorexis. Zonele glomerulară şi medulară sînt indemne din punct de vedere lezional (83).

La *şoarecele* mort de nevraxită herpetică în urma inoculării virusului intracerebral leziunile sînt caracterizate printr-un proces infiltrativ în meninge (fig. 95), inegal repartizat, fiind mai accentuat în meningele convexităţii creierului aproape de scizura mediană sagitală şi în meningele de la bază. Vasele meningelui prezintă infiltraţii în jur, formate predominant din elementele mononucleare şi rar polinucleare.

În parenchimul cerebral este prezentă o discretă infiltraţie cu celule mononucleare. Pe alocuri se observă o aglomerare de celule gliale şi mononucleare de infiltraţie ce dau leziunii un aspect nodular (fig. 96).

În interiorul septurilor procesele infiltrative sînt mai mult sau mai puţin accentuate.

În scoarţă ca şi în restul parenchimului cerebral se constată prezenţa hemoragiilor sub formă de extravazate capilare sau chiar de mici lacuri sanguine ce dilacerează parenchimul.

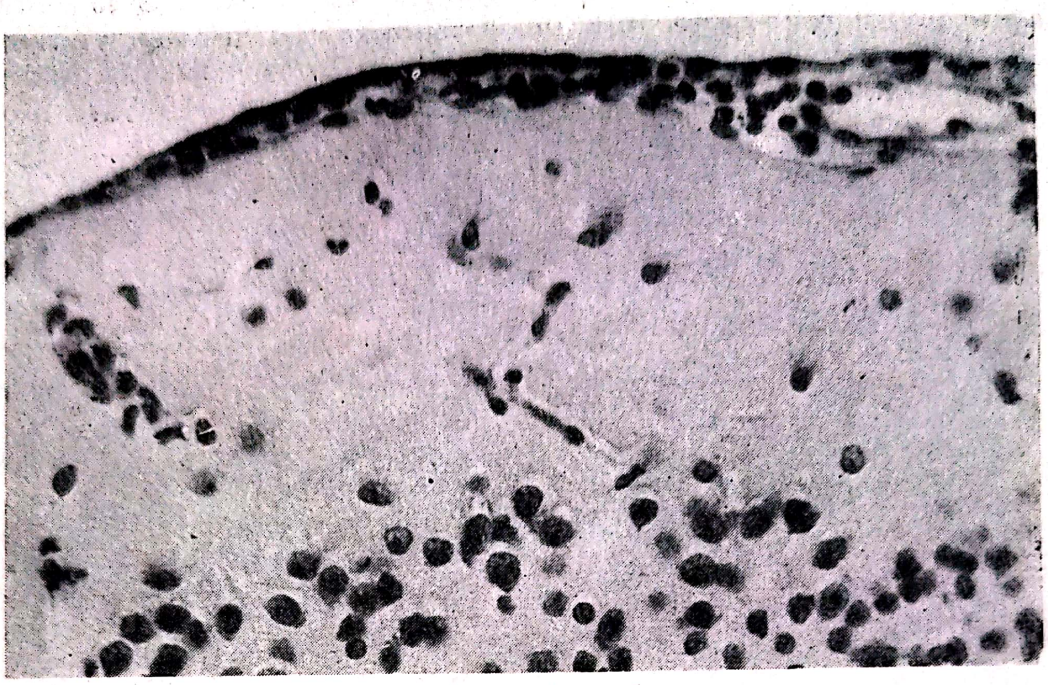


Fig.95. — Encefalită herpetică experimentală la șoarece. Meningită cu elemente mononucleare. Portocală, 1941.

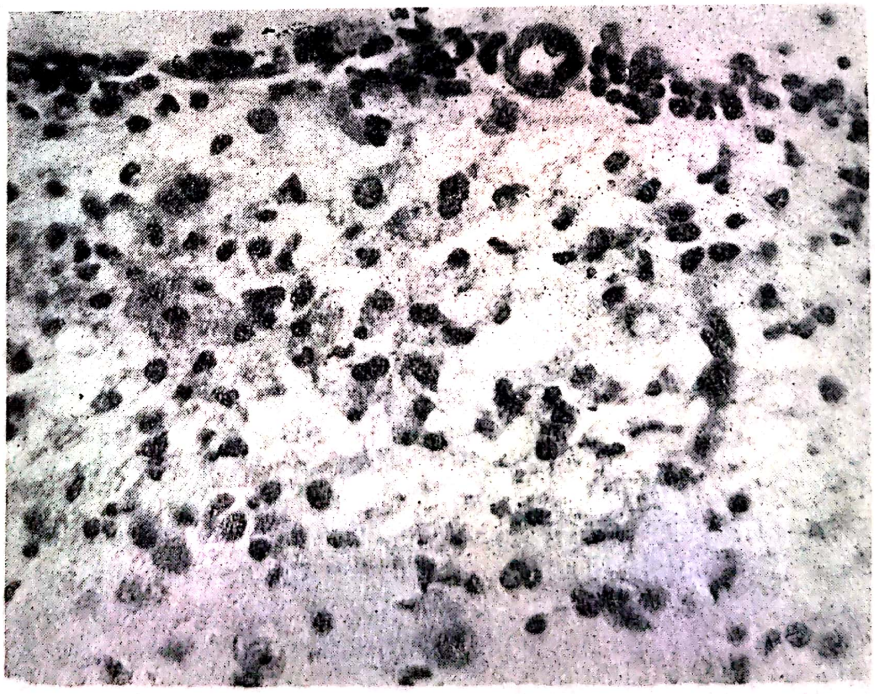


Fig.96. — Encefalită herpetică experimentală la șoarece. Focar de distrucție a parenchimului cerebral. Portocală, 1941.

Scanned with OKEN Scanner

Focarele necrotice ale substanţei nervoase cu prezenţa în aceste zone a numeroase celule gliale degenerate sînt caracteristice infecţiei herpetice la şoareci.

Histopatologic sînt prezente leziunile nucleare ale neuronilor, în special din cornul lui Ammon (fig. 97). Cromatina este dispusă în blocuri ne-

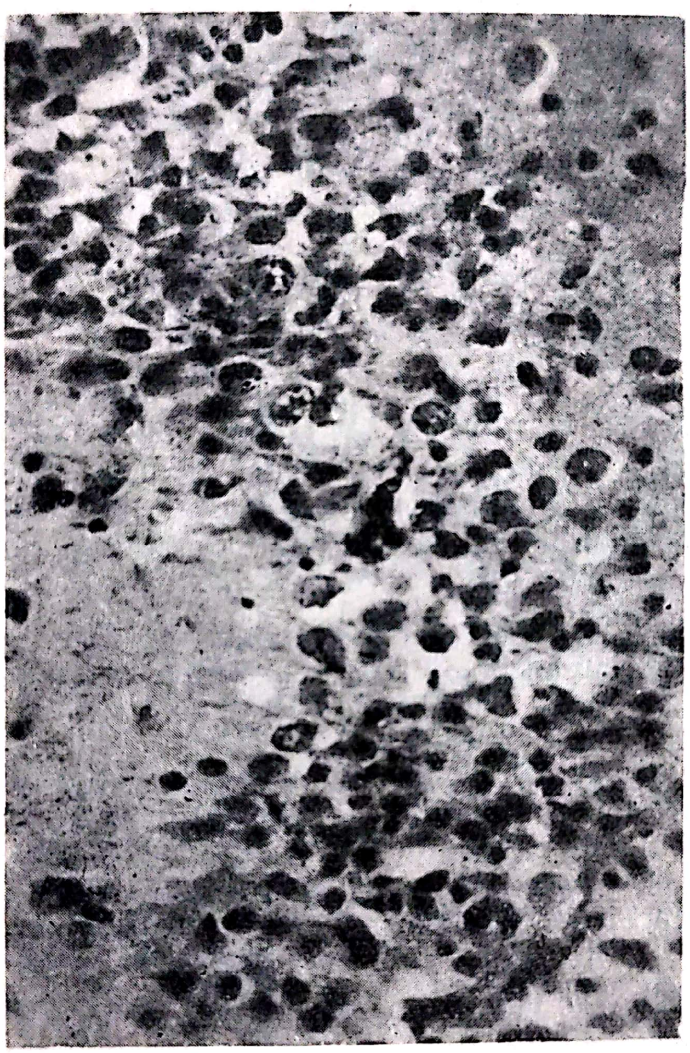


Fig.97. — Encefalită herpetică experimentală la şoarece. În cornul Ammon sînt prezente leziunile infiltrative şi alteraţiile neuronale; colonii de virus în nucleii neuronilor. Portocală, 1941.

reglate pe suprafaţa membranei nucleare (marginaţie cromatiniană) care diminuă treptat în dimensie şi număr, făcînd loc coloniilor de virus ce se dezvoltă. Ulterior cromatina poate dispărea complet şi nucleul este ocupat în întregime de inframicrobi.

În unii neuroni sînt prezente incluziile caracteristice herpesului.

Electronooptic, Wyckoff, Croissant şi Lépine (93) urmăresc evoluţia leziunilor produse de virusul herpetic în creierul de şoarece, folosind tehnica de fixare *in vivo* prin perfuzarea unei soluţii de acid osmic. Ei constată o modificare a reţelei cromatiniene, urmată de acumularea sa la periferia nucleului dînd aspectul de marginaţie cromatiniană. În această reţea cromatiniană au putut fi observate particule mai dense la electroni aşezate în ciorchine, care odată ce infecţia progresează, au o formă mai regulat rotunjită şi un diametru mai uniform.

Această aglomerare de particule ar reprezenta după autori incluziile ce se văd cu ajutorul coloraţiilor obişnuite la microscopul optic. În stadiul mai tardiv al infecţiei, citoplasma neuronilor prezintă şi ea această aglomerare de particule care s-ar datora ruperii membranei nucleare.

Şobolanul alb mort de encefalită herpetică experimentală prezintă în sistemul nervos central leziuni asemănătoare cu cele ale iepurelui, însă de intensitate mai mică.

Cobaiul se comportă la fel ca şoarecele şi şobolanul. Inocularea virusului în profunzimea pielei metatarsului labelor posterioare provoacă o leziune specială : la nivelul stratului lui Malpighi se constată formarea de pseudocelule gigante, asemănătoare cu cele din corneea de iepure. Celulele epiteliale rezultate din diviziunea amitotică apar parazitate, nucleul lor conţinînd colonii bogate în virus (Nicolau).

Maimuţa, mai rezistentă decît animalele precedente, face o encefalită cu o incubaţie mai lungă şi în consecinţă cu un aspect mai cronic. Totuşi, în cazurile mortale se găsesc leziuni comparabile cu ale iepurelui. Ele se caracterizează printr-un proces meningitic, reacţii inflamatorii perivasculare (fig. 98), noduli parenchimatoşi formaţi din elemente polinucleare şi degenerescenţă oxicromatică (fig. 99) a nucleilor neuronilor (44) (49) (94) (63) (23), cu prezenţa de incluzii în interiorul nucleului (fig. 100). În cazurile de neuroinfecţie autosterilizată mortală sau nemortală, se observă distrugeri vaste în encefal, care iau aspectul de porencefalie cavitară. Aceste ultime alteraţii au fost amănunţit studiate de Levaditi, Lépine şi Schoen (47) (48).

B. LEZIUNI ÎN INFECŢIA HERPETICĂ UMANĂ

1. LEZIUNI CUTANATE ŞI MUCOASE

La om, erupţia herpetică trece prin fazele de papulă, veziculă şi cîteodată prin faza de pustulă. La vindecare, ţesutul tegumentar şi cel mucos îşi recapătă aspectul iniţial, leziunea nelăsînd cicatrice.

Structura microscopică a eflorescenţei este cea care caracterizează orice leziune veziculoasă şi este foarte greu de diferenţiat de aceea din

herpesul zoster şi varicelă. Iniţial apare o proliferare a celulelor stratului mucos şi edem inter- şi intracelular fără atingerea corionului.

În herpesul recidivant, modificările histologice ale pielii între două puseuri eruptive, în regiunea în care erupţia se produce de obicei, sînt

Fig. 98. — Creier de maimuţă *Callitrix*. În scoarţa cerebrală sînt prezente manşoanele perivasculare. Levaditi, Lépine şi Schoen, 1929.

minime; Nicolau şi Poincloux (69) au observat numai o oarecare infiltraţie cu elemente mononucleare sub stratul lui Malpighi, cu o distribuţie perivasculară netă.

În herpesul experimental la om se observă mai întîi leziuni traumatice de inoculare, traduse microscopic printr-o descuamare a epiteliului, diapedeză cu polinucleare, mici hemoragii capilare şi prezenţa mitozelor în celulele pe cale de regenerare.

Aceste leziuni preced faza specific herpetică cu etapele sale de papulă şi veziculă, care evoluează însă la pustulă, apoi uscare şi regenerare a epiteliului. Microscopic leziunile sînt asemănătoare cu cele din vaccină; celulele epiteliului sînt disociate de un exsudat sero-fibrinos, au aspect degenerat cu citoplasmă pală şi nuclei acidofili. Unele din ele au aspectul celulelor „pseudo-gigante" cu 2—50 de nuclei.

Leziunile degenerative şi exsudative ce se observă în cursul vezicularii leziunii sînt similare cu leziunile din herpesul spontan.

Scanned with OKEN Scanner

Fig.99. — Creier de maimuţă *Callitrix*. Scoarţă cerebrală anterioară. Focar de encefalită cu leziuni nucleare a neuronilor, caracteristice infecţiei herpetice. Levaditi, Lépine şi Schoen, 1929.

Fig.100. — Creier de maimuţă *Callitrix*. În *a*, scoarţă cerebrală posterioară; prezenţa de corpusculi în nucleul neuronilor. În *b*, măduvă; focar de mielită, cu leziuni în nucleul neuronilor. Levaditi, Lépine şi Schoen, 1929.

Scanned with OKEN Scanner

2. LEZIUNI NERVOASE

În encefalita herpetică substratul morfopatologic are un caracter particular, caracterizat prin prezența leziunilor necrotice în substanța cenușie a creierului, cu o topografie predominant rinencefalică, și existența concomitentă a incluziilor intranucleare în celulele nervoase și gliale din aceste zone de necroză.

La copilul mic trecut de un an, sînt caracteristice din punct de vedere anatomic focarele de ramolisment localizate în polii temporali și occipitali.

Microscopic meningele este intens infiltrat cu elemente de aspect mononuclear, predominant în focarele de ramolisment.

În parenchim sînt prezente leziunile de necroză spongioasă, în special în circumvoluțiile calozo-marginale, leziunile necrozante din regiunea temporo-hipocampică și frecventele zone de necroză în frontala și parietala ascendentă, atît în cortex cît și în subcortex (13).

Infiltrațiile perivasculare sînt prezente în ambele zone.

În regiunea nucleilor centrali, capsula internă și corona radiantă, leziunile inflamatorii sînt de aspect difuz.

Incluziile intranucleare, foarte frecvente în special în vecinătatea zonelor de necroză, sînt prezente atît în neuroni cît și în celulele gliale.

Deși Tolentino și Matteis (84) au descris la un copil cu encefalită herpetică leziuni necrotice centrolobulare în ficat, cu prezența de incluzii intranucleare, în general la copilul trecut de 1 an atingerea viscerală este mult mai rară.

3. LEZIUNI ÎN INFECȚIA HERPETICĂ NEONATALĂ

În infecția herpetică diseminată (forma septicemică) a nou-născutului sînt caracteristice din punct de vedere anatomopatologic leziunile viscerale (predominant hepatice și corticosuprarenale), sistemul nervos central fiind mult mai rar afectat (62).

În *pulmon* sînt prezente leziuni difuze de alveolită cataralâ și edematoasă, cu o reacție interstițială formată din elemente limfo-mononucleare și plasmocitare, și leziuni focale variate ca intensitate și dimensie, unele interesînd grupe de alveole ce dau aspectul de leziune parcelară, iar altele mai întinse, sub formă lobulară, care pot conflua dînd aspectul unor focare masive.

Tipul leziunii este acela al necrozei de coagulare. Ea apare inițial în lumenul alveolei, extinzîndu-se apoi în tot lobulul pulmonar cu distrugerea completă a pereților interalveolari și bronhovasculari. Centrul zonei de necroză este format din celule poli- și mononucleare pe cale de picnoză și liză, iar periferia sa prezintă aceleași elemente, însă nealte-

Scanned with OKEN Scanner

rate. Unele celule de la periferia zonei necrotice, sînt hipertrofice, cu citoplasmă abundentă şi nucleul voluminos. Aceste celule prezintă leziuni tipice infecţiei herpetice, caracterizate prin marginaţie cromatiniană şi prezenţa de incluzii eozinofile de aspect omogen în interiorul nucleului (6). Este de semnalat faptul că în cazul adus de Le van Tinh şi colab. (53) examenul histopatologic nu evidenţiază însă prezenţa acestor leziuni.

În *ficat* sînt prezente leziunile difuze de degenerescenţă vacuolară şi congestia capilarelor. În focarele de necroză caracterizate prin liza celulelor nobile se constată prezenţa elementelor leucocitare pe cale de picnoză. În jurul acestor focare şi la distanţă de ele sînt prezente celule cu incluzii tipice infecţiei herpetice (6) (85) (7).

În cazul adus de Debré şi colab. (22), în zonele de necroză de coagulare constituite din celule hepatice şi hematii nu este semnalată prezenţa de elemente inflamatorii. Prezenţa incluziilor, în diverse stadii evolutive, au fost observate de autori în celulele de la limita dintre zona necrotică şi cea sănătoasă.

Le van Tinh şi colab. (53) pun în evidenţă, în cazul studiat de ei, aceleaşi leziuni necrotice localizate periportal şi centrolobular, de asemenea fără prezenţa infiltraţiilor inflamatorii. Autorii observă incluziile herpetice atît în celulele din jurul zonelor de necroză, cît şi în celulele endoteliale şi adventiceale ale vaselor intrahepatice.

După Lamy şi colab. (39) leziunile de necroză în infecţia herpetică diseminată au ca punct de plecare vasul şi ating mai des celulele decît ţesutul stromal.

În unul din cazurile lui Williams şi Jack (90) s-au observat focare difuze de necroză, fără o distribuţie zonală. Autorii descriu în acest caz prezenţa de rare celule hepatice binucleate şi procese infiltrative periportale, formate din elemente mononucleare. Celulele din jurul focarelor de necroză prezintă citoplasma de aspect degenerat, iar în nuclei se observă incluzii variate, unele foarte mari, de aspect eozinofil, cu halo în jur, iar altele de aspect sticlos cu nuanţă bazofilă. În cel de-al doilea caz, autorii constată arhitectonica hepatică complet dezorganizată de procesul hemoragic şi necrotic (necroza pereţilor vasculari). Aceleaşi leziuni de necroză hepatică au fost descrise şi de Quilligan şi Wilson (75), Zuelzer şi Stulberg (95), Bird şi Gardner (7), Lamy şi colab. (39) etc.

Într-unul din cazurile aduse de Tucker şi Scofield (85), la care evoluţia a fost rapid letală, erau prezente leziuni necrotic-hemoragice, cu incluzii în nucleii celulelor din jurul acestor focare.

În *cord* leziunile constau din zone de degenerescenţă vacuolară a fibrelor miocardice şi din focare de necroză de coagulare, localizate în jurul sau în apropierea vaselor (53) sau la nivelul fasciculului Hiss (6).

În unele cazuri (22) leziunile inflamatorii sînt prezente în epicard, endocardul şi miocardul avînd aspect normal.

Scanned with OKEN Scanner

În *splină* s-au descris de către Debré şi colab. (22) aceleaşi leziuni necrotice ca şi în ficat; zonele de necroză sînt uneori de dimensiuni mai mari, înglobînd vase ai căror pereţi sînt complet necrozaţi. Incluziile tipice infecţiei herpetice sînt prezente în nucleul celulelor reticulare de la periferia zonei de necroză.

În cazul adus de Le van Tinh şi colab. (53) focarele de necroză sînt însă absente. Totuşi s-a observat prezenţa aceloraşi incluzii în nucleul celulelor reticulare.

În *esofag* se constată leziuni ulcerative ale mucoasei, la periferia cărora se găsesc numeroase celule malpighiene cu incluzii intranucleare în diverse stadii evolutive, ele fiind prezente şi în interiorul citoplasmei acestor celule.

Submucoasa prezintă dilataţie şi congestie capilară cu infiltraţie imfo-monocitară în jur (22) (85).

La nivelul *suprarenalelor* aceleaşi focare de necroză sînt localizate la nivelul zonelor fasciculară şi reticulară, în jur cu numeroase celule cu incluzii intranucleare, caracteristice herpesului (22) (53) (90) (85).

În *creier*, indiferent că boala îmbracă aspectul unei forme septicemice sau al unei meningo-encefalite, leziunile anatomopatologice sînt identice ca aspect.

Macroscopic, sînt prezente mici focare de aspect albicios, care nu sînt altceva decît zone de necroză.

Ele se caracterizează prin procese necrotic-hemoragice sau prin focare de rarefacţie necrotică localizate în cortextul cerebral (în special în lobul temporal, hipocamp şi occipital), în comisura anterioară şi hipotalamus şi mai rar în nucleul roşu, protuberanţă, cerebel, bulb şi măduvă (88) (95) (35) (91).

La unele din cazuri se constată prezenţa de neuronofagii sau de celule în cariorexis cu incluzii intranucleare şi procese perivasculare limfo-monocitare şi hemoragice, atît în leptomeninge cît şi în parenchimul cerebral.

Uneori, în substanţa albă a creierului se observă alteraţii celulare degenerative şi o reacţie astrocitară.

În celulele nervoase corticale se constată marginaţia cromatinei nucleare şi prezenţa incluziilor caracteristice herpesului.

Particular din punct de vedere anatomopatologic este cazul adus de Wildi (89), la care leziunile sînt localizate în cortexul cerebelos şi în lobii frontali; procesele inflamatorii şi trombozele vasculare sînt prezente în substanţa albă a lobului frontal. După autor, sediul acestor leziuni (prezenţa trombozelor în substanţa albă) corespunde întru totul modului de diseminare a virusului pe cale hematogenă.

În cazul de faţă, prezenţa incluziilor eozinofile intranucleare ar depinde, după autor, de gradul de maturare a diferitelor structuri afectate. Evidenţierea lor a fost posibilă numai în structurile cerebrale, deja dife-

Scanned with OKEN Scanner

renţiate la naştere ; în neuronii încă nematurizaţi din izocortex, dezvoltarea incluziilor ar fi, după autor, blocată într-un anumit stadiu.

Aşa cum am arătat într-un capitol anterior, după unii autori, formarea incluziilor în infecţia herpetică ar trece prin cîteva stadii. Ele sînt la început slab eozinofile (datorită cantităţii mici de acid dezoxiribonucleic), şi de dimensii mari cuprinzînd întreg nucleul celulei. Urmează apoi o fază de retractare a lor cu formarea haloului în jur.

C. INCLUZIILE HERPETICE

Se ştie că incluziile nu sînt altceva decît corpusculi elementari aglutinaţi şi modificaţi de reacţiile de apărare ale organismului (68). Incluziile

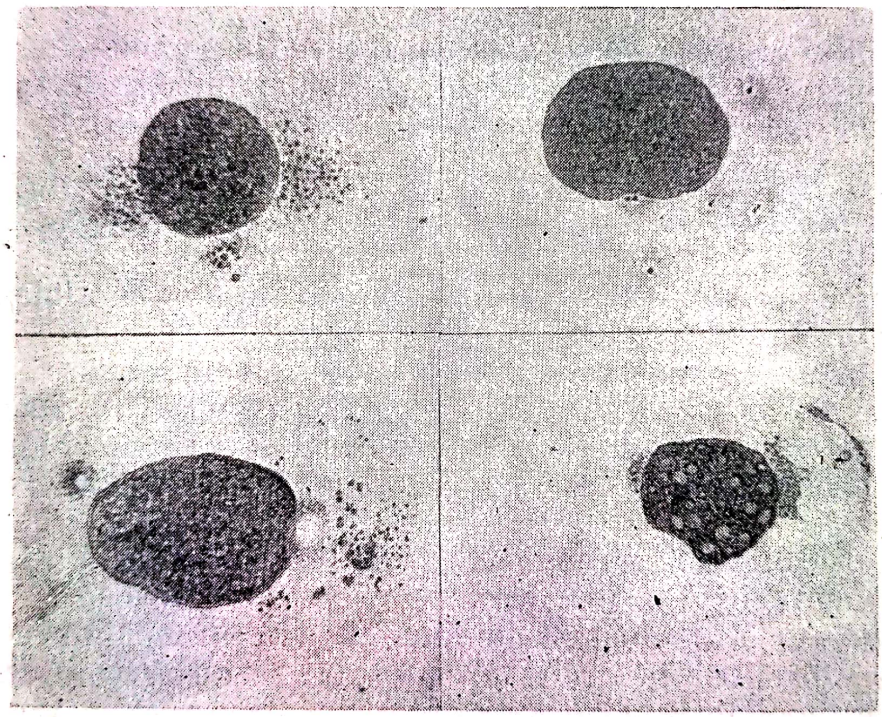


Fig.101. — Herpes corneean la iepure. Celule corneene cu germeni inframicrobieni prezenţi în citoplasmă. Löwenstein, 1921 (desen original).

au fost descrise de numeroşi autori ; în infecţia herpetică însă, în interpretarea lor, a domnit confuzia timp îndelungat. În procesele herpetice, la om sau la animalul de experienţă, au fost descrise numeroase formaţiuni incluse în celule şi care ar fi în relaţie cu agentul etiologic al infecţiei. Iată înşiruirea acestor formaţiuni :

a) corpusculii citoplasmici ai lui Löwenstein (55), găsiţi în 1919, în celulele corneene din cheratita iepurelui (fig. 101) şi în veziculele de herpes uman ; ei sînt de dimensii mici, la limita vizibilităţii ;

b) corpusculii lui Lipschütz (54), văzuţi şi de Blanc şi Caminopetros (8), de Kooy (38) în nucleul celulelor epiteliale ; au fost descrişi pe secţiunile colorate cu Giemsa după prealabila fixare în lichidul lui Schaudine ; sînt de dimensia a 2 μ rotunzi sau ovalari şi de culoare roşie, net distincţi de cromatina nucleară şi de nucleolii colorabili în albastru. Ei sînt, după autor, formaţi dintr-un număr mare de corpusculi elementari.

Aceşti corpusculi au fost clasificaţi în mod eronat în grupul clamydozoastrongyloplasmelor.

După Luger şi Lauda (58), care-i pun în evidenţă în ţesuturile normale, corpusculii lui Lipschütz nu ar fi altceva decît corpi de degenerare ;

c) neurocorpusculii oxifili intranucleari din neuronii cerebrali la iepurii morţi de encefalită herpetică experimentală ; ei au fost descrişi de Levaditi, Harvier şi Nicolau în 1921 (45) în „zona electivă" şi pot fi iden-

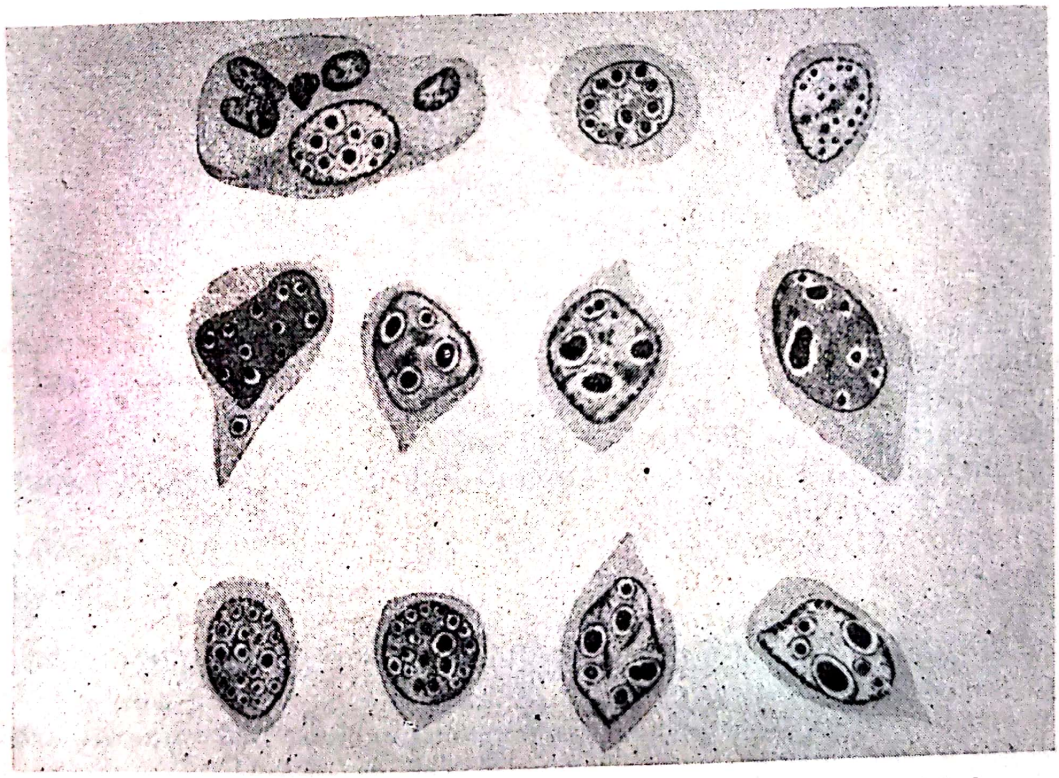


Fig.102. — Neuroni cerebrali de iepure mort de encefalomielită herpetică experimentală. Incluzii în nucleii neuronilor din lobul piriform. Levaditi, Harvier şi Nicolau, 1922.

tificaţi cu formaţiunile găsite ulterior de Goodpasture şi Teague (30), de Cowdry şi Nicholson (15) de le Fèvre de Arric (41) etc. în nucleul celulelor epiteliale ; aceste formaţiuni, a căror dimensie variază de la limita vizibilităţii pînă la 2 sau 3μ, au un halo în jur (fig. 102) ;

d) „minute bodies", ale lui Da Fano şi Ingleby (19), mici corpusculi bazofili, situaţi în citoplasma neuronilor sau chiar extracelulari (fig. 103);

e) „paraziţii" lui Löwenthal (57) din citoplasma celulelor epiteliale ale corneii de iepure inoculat experimental şi pe care autorul i-a interpretat ca microsporidii;

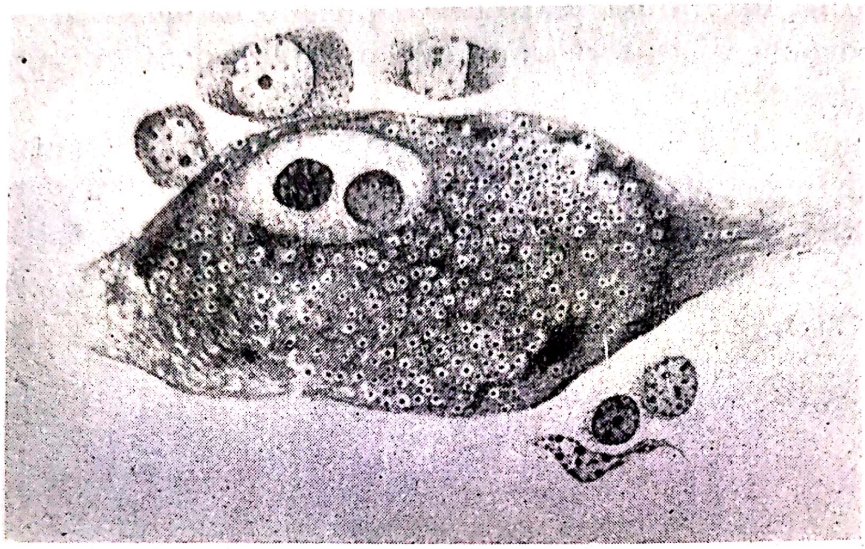


Fig. 103. — Encefalită umană; celulă nervoasă în care se observă numeroase granulaţii colorabile cu albastru de toluidină (*minute bodies*). Da Fano, 1921.

f) *Neurocystis herpetii* descrişi de Levaditi şi Schoen (52) în citoplasma neuronilor cornului lui Ammon de iepure mort de encefalită herpetică au fost consideraţi de asemenea ca un ciclu evolutiv al parazitului, foarte probabil în relaţie cu agentul etiologic al bolii;

g) incluziile oxifile descrise de Guiraud şi Thomas (34) în citoplasma celulelor lui Malpighi din pielea umană;

h) formaţiunile eozinofile diverse, descrise de Alberca-Lorente (3) în citoplasma monocitelor de infiltraţie şi în fibroblaste, ca şi în citoplasma sau nucleii neuronilor, la iepurele de experienţă;

i) formaţiuni asemănătoare corpilor lui Guarnieri în epiteliul corneean al iepurilor sau în epiteliul cutanat uman, descrise de Watanabe (86) (87) şi pe care autorul japonez le-a putut reproduce chiar prin injecţii locale de toxină microbiană etc.

Dacă lăsăm la o parte elementele datorite artefactelor, proceselor de degenerescenţă sau de fagocitoză, resturi nucleare fagocitate, resturi celulare intracitoplasmice, hematii fagocitate, mitocondrii, pigmenţi etc., elementele ce rămîn din toate aceste „incluzii" herpetice pot fi socotite ca făcînd parte din două feluri de formaţiuni: incluzii nucleare veritabile şi incluzii citoplasmice.

Incluziile herpetice sînt formaţiuni ce iau naştere în *marea majoritate a cazurilor în nucleu*. La iepure ele sînt localizate în nucleul neuronilor en-

cefalici şi sînt găsite frecvent în „zona electivă". Este vorba de corpusculi eozinofili, cu dimensiuni de la 1 la 3—4 μ, care iau naştere în sînul coloniilor intranucleare de germeni (fig. 104) şi în mod excepţional în citoplasma (fig. 105) neuronilor parazitaţi (Nicolau). Incluziile herpetice există de

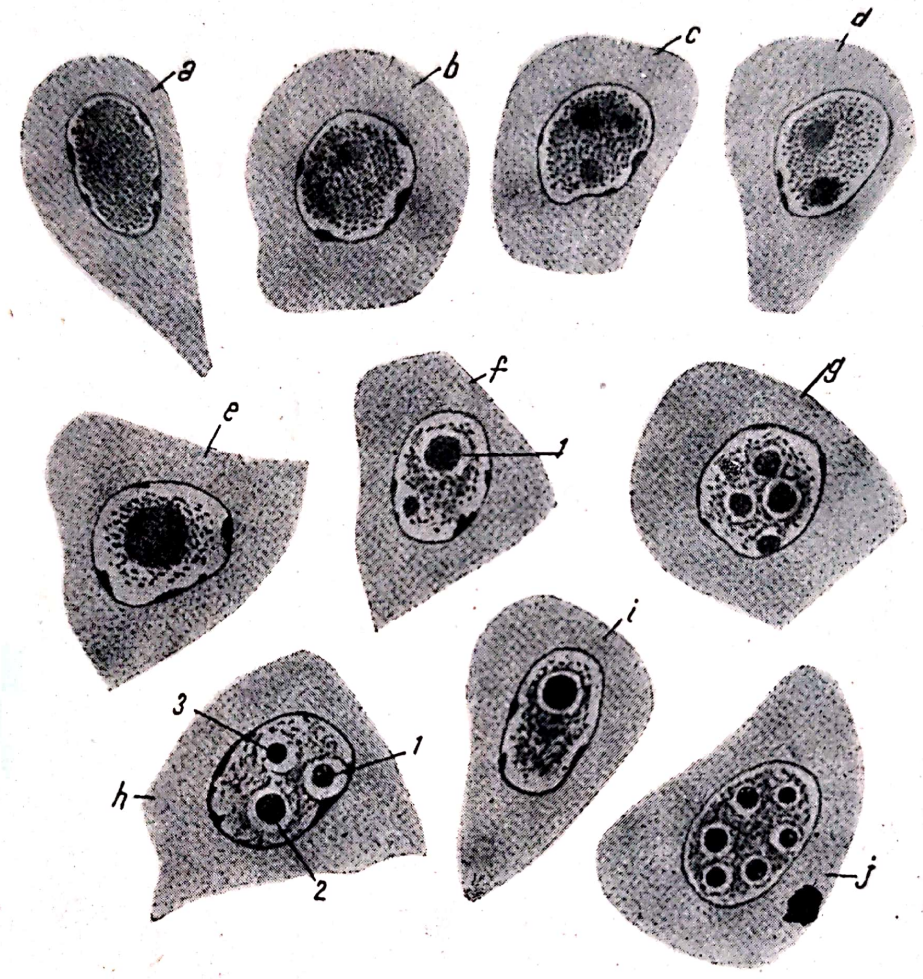


Fig. 104. — Neuroni cerebrali de iepure mort de encefalită herpetică experimentală; nucleii sînt parazitaţi de inframicrobi herpetici. Stadii succesive ale formării incluziilor; *a*, neuron al cărui conţinut al nucleului este format din numeroşi inframicrobi; *b*, în masa de germeni, cîteva elemente cu tendinţa de a se aglutina; *c*, aglutinarea germenilor în trei puncte diferite ale masei de inframicrobi; *d*, se disting cu greu în aglutinate, germenii care pierd individualitatea lor şi integritatea morfologică; *e*, un corpuscul mare (preincluzie) format din elemente aglutinate, înconjurate de inframicrobi liberi; *f*, în jurul unui corpuscul rezultat din aglutinarea germenilor (*1*) se formează un halo; *g*, patru corpusculi rezultaţi din aglutinarea germenilor; *h*, doi corpusculi (*1* şi *2*) constituiţi din germeni aglutinaţi şi sudaţi, şi care nu au încă aspectul omogen al incluziei eozinofile al celui de-al treilea corpuscul (*3*); *i*, incluzie herpetică înconjurată de halo; *j*, şase incluzii eozinofile, omogene, formate prin aglutinarea şi degenerarea inframicrobilor. Nicolau şi Kopciowska, 1937 (desen schematizat).

asemenea în epiteliul cornecan al iepurilor afectaţi de cheratită herpetică, în leziunile tegumentare, în celulele malpighiene din regiunea plantară a cobaiului inoculat cu virus, în profunzimea epiteliului plantar al regiunii

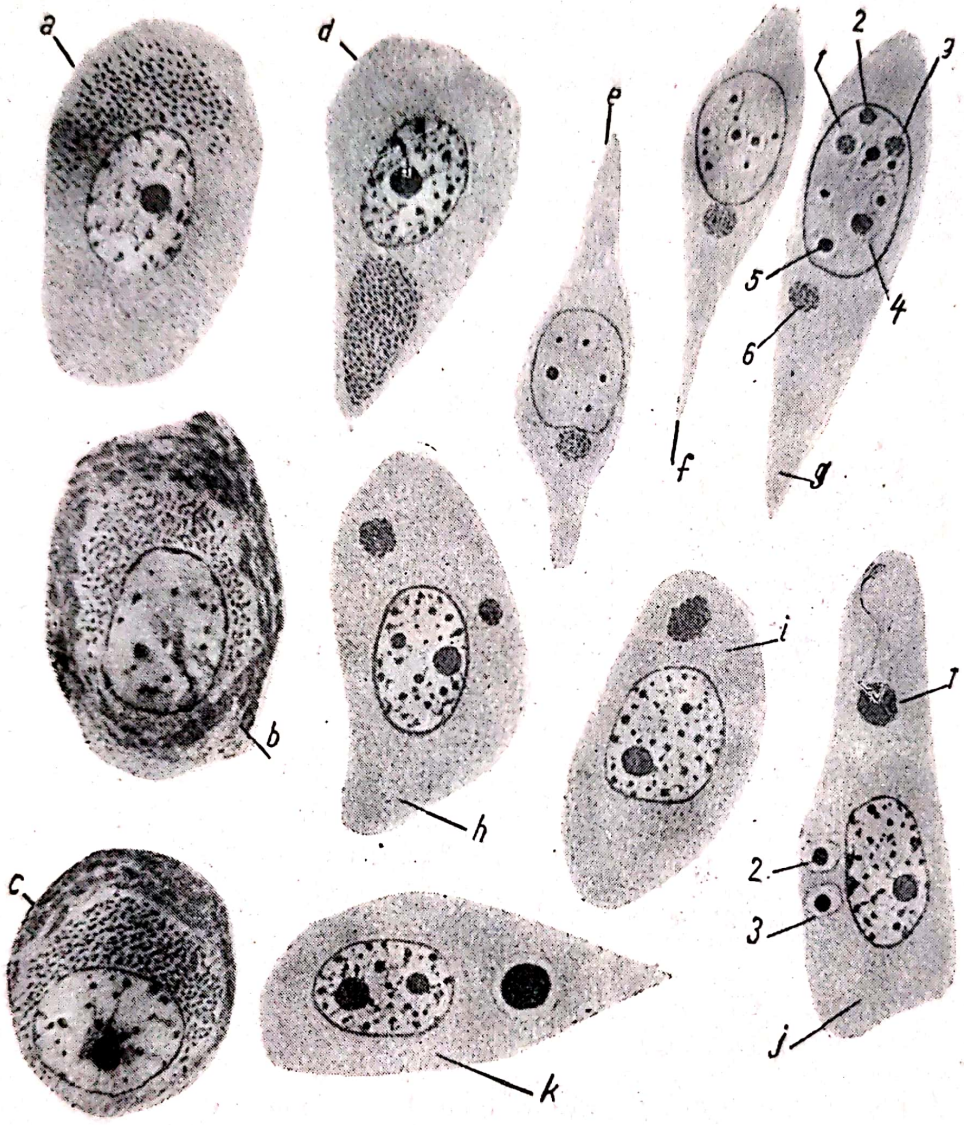


Fig.105. — Neuroni cerebrali de iepure mort de encefalită herpetică experimentală; în citoplasmă se constată prezenţa de germeni herpetici; *a*, *b* şi *c*, virus diseminat în protoplasmă; *d*, masă de germeni la un pol al celulei; *e* şi *f*, germeni intracitoplasmici aglutinaţi într-o formaţiune sferică (se remarcă de asemenea incluzii nucleare, mici, înconjurate de halo); *g*, formaţiuni sferice (preincluzii) constituite din germeni aglutinaţi, în nucleu (*1*, *2*, *3*, şi *4*) şi în citoplasmă (*6*), şi incluzii eozinofile omogene, intranucleare, înconjurate de halo (*5*); *h* şi *i*, corpusculi rotunzi intracitoplasmici, formaţi din germeni aglutinaţi şi sudaţi; *j*, corpuscul voluminos (*1*) format prin aglutinarea şi sudarea inframicrobilor şi două incluzii omogene (*2* şi *3*) înconjurate de halo; *k*, incluzii citoplasmice herpetice, omogene, rezultate din degenerescenţa şi topirea germenilor într-un corpuscul rotund, unic. Nicolau şi Kopciowska, 1937 (desen schematizat).

Scanned with OKEN Scanner

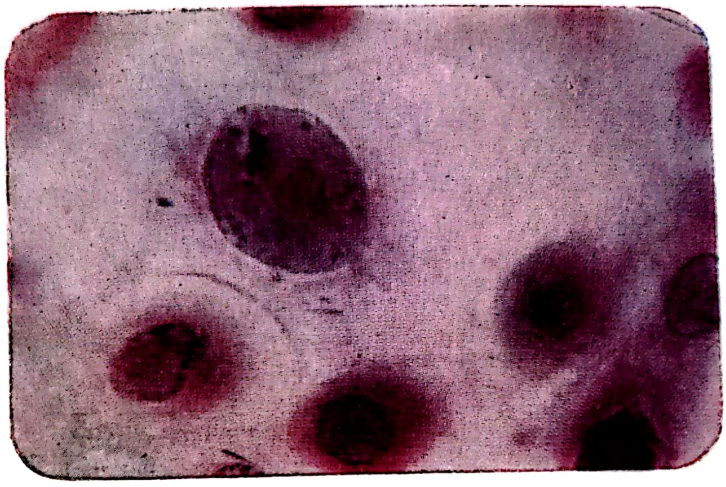


Fig. 106. — Celule amniotice umane infectate cu virus herpetic *simplex*. Plaje de virus în nucleul celulelor. Colecţia Institutului de inframicrobiologie al Acad. R. S. România.

Fig. 107. — Celule amniotice umane infectate cu virus herpetic *simplex*. Plaje de virus şi incluzii în interiorul nucleilor. Colecţia Institutului de inframicrobiologie al Acad. R. S. România.

Scanned with OKEN Scanner

metatarsiene a labelor posterioare, în celulele care servesc drept mediu pentru cultivarea virusului *in vitro* (fig. 106 şi 107) (76) (4) (2), precum şi în celulele membranei corioalantoide a embrionului de găină infectat cu acest virus (21).

Numeroşi autori au desemnat drept incluzii herpetice coloniile de germeni care ocupă o mare parte din nucleul celulei parazitate. În realitate, aşa cum s-a demonstrat recent, incluziile sînt constituite din inframicrobi herpetici aglutinaţi, degeneraţi şi sudaţi în corpusculi rotunjiţi şi eozinofili, deseori înconjuraţi de un halo care îi separă de elementele inframicrobiene individualizate, din sînul cărora au luat naştere (Nicolau).

HISTOCHIMIA INCLUZIEI

Taylor şi colab. (81), Smadel şi Hoagland (79) şi Knight (37) au arătat că unele virusuri animale au în compoziţia lor o nucleoproteină ce conţine ADN. Cercetările lui Pollister şi Ris (72) au demonstrat apoi că această nucleoproteină este Feulgen pozitivă. Folosind această reacţie, Lépine şi Sauther (42) au demonstrat, cu un an înainte, că incluzia herpetică este Feulgen negativă, de unde concluzia acestor autori că ea nu ar conţine virus. Aceste rezultate erau aşadar complet opuse celor obţinute de Baumgartner (5), care izbutise să separe cu ajutorul microdisecţiei incluzii individuale din celulele corneene de iepure infectat şi să reproducă leziuni specifice herpesului prin inocularea lor pe corneea scarificată de iepure.

Faptul constatat de Bland şi Robinow (10), că incluziile din vaccină au un ciclu de dezvoltare în cursul căruia aspectul şi proprietăţile tinctoriale s-ar schimba, i-a determinat pe Crouse şi colab. (16) să cerceteze în herpes posibilitatea existenţei unui asemenea ciclu care ar putea explica aspectul variat al acestor incluzii. Studiile s-au făcut pe secţiuni de membrane corioalantoide, infectate cu o suspensie de virus ce conţinea aproximativ 10 000 particule în 0,1 ml şi recoltate în primele 12 ore la intervale orare, apoi la cîte 2 ore, de la ora a 12-a la a 22-a de la infectare, iar apoi la 25, 28, 30, 36, 40, 60 şi 72 de ore. La 10 ore de la inoculare, autorii constată în celulele ectodermice apariţia de rare incluzii Feulgen pozitive, pentru ca la 20 de ore majoritatea celulelor din acest strat să conţină cîte o incluzie mare, omogenă, Feulgen pozitivă. După 30 de ore ele încep să apară şi în celulele mezodermice.

Incluziile au fost observate însă în stratul endodermal începînd de la 48 de ore după infectare.

Incluzia variază din punct de vedere tinctorial, astfel încît după acest aspect se poate determina vîrsta ei. Între 10 şi 18 ore de la inocularea membranei corioalantoide cu virus, autorii observă prezenţa de incluzii omogene, Feulgen pozitive şi colorate în albastru cu toluidină. Acest aspect se menţine pînă la 24 de ore, unii din nucleii celulelor avînd însă reacţia Feulgen mai intensă decît alţii. La perioade de timp mai tîrzii infecţiei, incluziile apar, după aceşti autori, colorate în albastru cu toluidină şi cu o reacţie

Feulgen slab pozitivă. Începînd de la 30 de ore, incluzii cu halo clar în jur apar Feulgen negative, necolorabile cu albastru de toluidină.

Reacţia Feulgen pozitivă a incluziei, în unele stadii ale infecţiei, demonstrează că ea conţine nucleotide dezoxiribozice şi este deci formată din agregate de corpusculi virotici. Prezenţa unei fosfataze alcaline în nucleul celulelor infectate cu herpes în concentraţii ce variază cu perioada infecţiei arată corelaţia constatată de Brachet şi Jeener (12) între conţinutul în fosfatază şi *turn over*-ul fosforului din acidul dezoxiribonucleic (ADN).

Crouse, Coriell, Blank şi Scott (16) au fost deci acei autori care au demonstrat citochimic că incluziile nucleare din stadiul precoce al infecţiei herpetice conţin o nucleoproteină dezoxiribozică. Acest fapt a fost apoi confirmat şi de Wolman şi Behar (92), care, în urma rezultatelor obţinute, conchid că incluzia herpetică nu ar reprezenta altceva decît o colonie de germeni virotici în interiorul matricei nucleare.

Cercetări interesante făcute de Scott, Burgoon, Coreill şi Blank (78) au demonstrat însă că în celulele corneene de iepure, multiplicarea virusului se produce înainte ca incluziile eozinofile să devină Feulgen negative.

Gray şi Scott (32) au dovedit că virusul este prezent în nucleu în primul stadiu al infecţiei. Datele acestor autori au fost deci deosebite de acelea ale lui Francis şi Kurtz (27) şi Ackerman şi Kurtz (1), care arătaseră că fracţiunea citoplasmică a celulelor hepatice de embrion de găină este mai infectantă decît fracţiunea nucleară.

Portocală, Velicicov şi Copelovici (74), efectuînd cercetări asupra prezenţei ADN-ului în cursul infecţiei herpetice experimentale la iepure, constată cu ajutorul reacţiei Feulgen o creştere a conţinutului în acid dezoxiribonucleic a nucleilor celulelor. Cantitatea de ADN, redusă în primele faze ale infecţiei, creşte progresiv cu infecţia în interiorul coloniei de virus, reacţia Feulgen fiind intensă. După aceşti autori, fenomenul s-ar explica printr-o stimulare a sintezei acidului nucleic sub influenţa prezenţei virusului în nucleu.

Newton şi Stoker (64) demonstrează de asemenea că ADN creşte rapid în celulele HeLa infectate cu virus herpetic, el fiind deci sintetizat de îndată ce s-a produs infecţia.

BIBLIOGRAFIE

1. Ackermann, W. W., Kurtz, H. B. — J. exp. Med., 1952, **96**, 151.
2. Akazaki, K. — Arch. exp. Zellforsch., 1937, **20**, 89.
3. Alberca-Lorente, R. — *Estudio histopatologico de la encephalitis experimental* — Teză, Madrid, 1928.
4. Andrewes, C. H. — J. Path. Bact., 1930, **33**, 301.
5. Baumgartner, G. — Schweiz. med. Wschr., 1935, **16**, 759.
6. Bernard, R., Payan, H., Tamalet, J., Audibert, G. — Sem. Hôp. Paris, 1961, **37**, 2653.
7. Bird, T., Gardner, P. S. — Brit. med. J., 1959, **14**, 993.
8. Blanc, G., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, **84**, 629.
9. Blanc, G., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, **84**, 767.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 5

PROFILAXIE ŞI TRATAMENT

1. IMUNIZAREA ACTIVĂ

Este cunoscută din cele prezentate anterior că animalele inoculate cu virus herpetic activ fac boala herpetică, iar cele care supravieţuiesc rămîn cu o imunitate solidă.

S-a arătat de asemenea faptul că suspensiile de virus herpetic inactivat sînt active, starea refractară căpătată de animalul respectiv fiind însă trecătoare. Bedson (6), tratînd virusul cu formol $2^0/_{00}$, obţine cu acesta o imunizare solidă la cobai. Supus căldurii (60°C sau 100°C) virusul s-a dovedit lipsit de acţiune imunizantă. Tratat însă cu formol înainte de a fi încălzit la 100°C virusul este capabil de a provoca la cobai o oarecare imunitate.

Prin administrarea unui vaccin antiherpetic sub formă de lichid de cultură celulară de rinichi de iepure, în care virusul a fost în prealabil inactivat cu ajutorul razelor ultraviolete, Anderson şi Kilbourne (2) izbutesc să obţină o imunizare solidă a şoarecelui. Inoculat intravenos sau intraperitoneal, animalul devine rezistent faţă de inocularea de probă cerebrală cu 1000 LD_{50}. Aceleaşi rezultate le obţin recent şi Lépine şi colab. (75 *a*) folosind ca vaccin lichidul de culturi celulare de rinichi de embrion de oaie infectate cu virus herpetic şi inactivat cu ultraviolete.

Watkins şi Lepow (129) asociază iradierea cu raze X la imunizarea activă. Şoarecii iradiaţi cu 24 de ore înainte şi imunizaţi intranazal cu virus herpetic, s-au dovedit a fi tot atît de sensibili ca şi martorii la inocularea de probă intracerebrală.

La om, toate încercările de imunizare împotriva infecţiei herpetice cu virus fie omorît fie atenuat prin diverse mijloace nu au dus la rezultate concordante.

S-a demonstrat de către Anderson şi colab. (1) că vaccinul antiherpetic inactivat nu are nici o acţiune profilactică la copilul mic. Din contră Henocq şi colab. (51 *a*) aplicînd vaccinul inactivat prin ultraviolete la oameni cu herpes recidivant obţin în 80% din cazuri rezultate bune.

2. IMUNIZAREA PASIVĂ

Bedson şi Crawford (7) obţin o hiperimunizare a cobailor prin inocularea virusului herpetic fie intraplantar prin scarificare sau injecţie intradermică, fie pe pielea epilată ; serurile cobailor vindecaţi de boala experimen-

Scanned with OKEN Scanner

tală conferă acestei specii animale o imunitate pasivă. Administrate în doză de 20 ml pe cale intraperitoneală serurile hiperimune determină o diminuare a receptivităţii cobailor faţă de virusul herpetic inoculat intraplantar sau o protecţie faţă de infecţia pe cale cutanată.

Studiind aceeaşi acţiune a serului antiherpetic, Andervont (3), Gildemeister şi Ahlfeld (40), Burnet şi Lush (14), Berry şi Slavin (8) obţin la şoarece o bună protecţie faţă de infecţie herpetică.

Cercetările efectuate ulterior de Evans, Slavin şi Berry (33) au demonstrat că momentul administrării serului este de mare importanţă în obţinerea unui bun rezultat. Administrarea intraperitoneală la şoarece a serului hiperimun concomitent cu inocularea intraplantară a virusului protejează animalul contra infecţiei, în timp ce administrarea sa la 12 sau 48 de ore de la inocularea virusului nu mai are aceeaşi eficacitate.

Watkins şi Lepow (129), administrînd intraperitoneal sau intravenos la şoarece serul hiperimun de iepure nu obţin nici o protecţie faţă de inocularea virusului pe cale intracerebrală. Ei constată de asemenea că administrarea intravenoasă a serului hiperimun homolog la această specie animală nu se poate conferi o protecţie împotriva infecţiei herpetice. Autorii încearcă să combine imunitatea activă cu cea pasivă. După 1 oră de la inocularea virsului pe cale intranazală, administrează 0,2 ml ser hiperimun de iepure pe cale intraperitoneală; efectuînd după 10 zile inoculările de probă pe cale intracerebrală, autorii constată că această dublă imunizare (activă şi pasivă) duce la o reducere semnificativă a rezistenţei conferite numai prin inocularea virusului pe cale intranazală.

Iepurele poate fi protejat contra inoculării corneene, prin injectarea intravenoasă a serului imun (38) (70) (84); acelaşi ser nu poate însă împiedica dezvoltarea maladiei conferite pe cale cerebrală şi nu întrerupe cursul encefalomielitei declarate.

Doi ml de ser administrat intravenos cu jumătate de oră înaintea inoculării virusului pe cornee sînt suficienţi pentru a proteja apariţia cheratitei herpetice; calea de administrare intravenoasă s-a dovedit a fi mult mai activă în infecţia herpetică corneeană decît cea suboccipitală (70).

TRATAMENT

Tratamentul infecţiei herpetice a fost limitat pînă în ultimul timp doar la o medicaţie simptomatică. De la descoperirea virusului au fost încercate în special în herpesul simptomatic, diverse tratamente ca: aplicaţii de pulberi inerte, dermatol, soluţie slabă alcoolizată, unguente sicative sau sulfamidate etc., fără rezultate din cele mai bune.

În herpesul recidivant s-au aplicat, tot fără rezultate satisfăcătoare, diverse tratamente ca: bismutoterapia la sifilitici cu herpes recidivant

Scanned with OKEN Scanner

(19) sau herpetici nesifilitici (96), autohemoterapia (88), urotropina (78), inoculări cu limfă vaccinală (134) (41) (39), hormon tiroidian (107), insulină, raze ultraviolete, raze X (86) (105) (73) etc. Razele Roentgen s-au dovedit totuşi a avea o oarecare valoare în tratamentul herpesului prin aceea că grăbesc vindecarea.

Minami, Seigo şi Ohmichi (87), Haack (46) şi Hruszek (54) au aplicat metoda preconizată de Plesch (citat după Hruszek (54), de autoinoculare în serie, însă rezultatele obţinute au fost inconstante.

Nicolau şi Poincloux (91) (92) (93), folosind pentru prevenirea erupţiei herpetice recidivante raclajul pielei afectate urmat apoi de grefa de piele sănătoasă, obţin vindecări definitive.

Cercetări întreprinse de diverşi autori au căutat să dovedească dacă prin administrarea vaccinului antiherpetic nu s-ar putea împiedica sau măcar rări recidivele.

Subladze şi Huan-Chi-Şan (119) inoculează un antigen folosit în special în testul alergiei cutanate la 10 bolnavi cu forme acute de herpes *simplex* sau herpes genital şi obţin o vindecare rapidă a leziunii. Rezultatele obţinute îi determină pe autori să considere că acest antigen are şi o acţiune terapeutică.

Sohier, Sepetjian şi Riffat (116) nu pot însă face o corelaţie între titrul anticorpilor fixatori de complement existenţi înaintea efectuării testului de indradermoreacţie şi apariţia sau neapariţia unei alergii cutanate, antigenul herpetic folosit neinfluenţînd decît în mică măsură titrul anticorpilor herpetici.

În prevenirea recidivelor herpetice s-a mai folosit virus herpetic inactivat (9) (90), autoinoculări cu virus activ (74) (81), fracţiunea antigenică S (solubilă) (114), însă rezultatele obţinute nu au fost unitare.

Panscherewski şi Hohde (95), administrînd subcutanat virus herpetic activ la bolnavii cu herpes recidivant, stomatită aftoasă şi eritem polimorf de origine herpetică, obţin ameliorări clinice evidente. Rezultatele bune s-ar datora după autori unei creşteri a titrului anticorpilor antiherpetici sub acţiunea acestui vaccin.

Herzberg (53), Gobbo (42) utilizează în acelaşi scop vaccinul antivariolic. Rezultatele nu au fost satisfăcătoare fapt care aduce un argument în plus că între virusul herpetic şi cel vaccinal nu există imunitate încrucişată. De altfel, Meurer (85) constată că recidivele herpetice apar destul de des la persoanele vaccinate, iar Naseman (89) descrie chiar existenţa herpesului recidivant la foşti bolnavi de variolă.

Totuşi, Eyeres şi Pirtle (36), imunizînd repetat cu virus vaccinal 30 de indivizi cu herpes recidivant, obţin rezultate bune. Eficienţa tratamentului aplicat a fost pusă de autori pe seama unei interferenţe între aceste două virusuri.

Plecînd de la faptul că în poliomielită, alături de starea refractară specifică propriu-zisă, se instalează o rezistenţă nespecifică heterologă

Scanned with OKEN Scanner

faţă de virusul herpetic, Monica Nicolau administrează vaccinul antipoliomielitic de tip Salk la bolnavi cu herpes recidivant şi obţine rezultate bune, recidivele fiind sau suprimate ani de zile, sau mult rărite.

Cu acelaşi scop, Lotreanu urmăreşte de cîţiva ani bolnavi cu herpes cronic recidivant supuşi unui tratament cu vaccin antipoliomielitic (3 serii a cîte 3 doze de vaccin la interval de 7—10 zile). Pînă în prezent, din cei 40 de bolnavi vaccinaţi antipoliomielitic, 21 (52%) nu au mai făcut recidive, 4 (10%) s-au ameliorat, iar restul de 15 — din motive obiective — nu au mai putut fi urmăriţi.

1. TRATAMENTUL FORMELOR CLINICE ALE INFECŢIEI HERPETICE

În general, în cazul unei leziuni herpetice cutaneo-mucoase, este recomandată asepsia locală, folosirea unguentelor cu antibiotice pentru prevenirea infecţiilor secundare, a antisepticelor uşoare (tamponări cu hipermanganat de K, în special în herpesul nazal).

Deşi este ştiut faptul că penicilina, streptomicina, aureomicina, eritromicina, cloramfenicolul etc. nu au nici o acţiune asupra virusului herpetic (4) (49) (13) (115) (133), în cazuri grave de herpes se impune totuşi administrarea lor pe cale generală cu scopul de a preveni infecţiile secundare locale şi generale.

Recent, Duluc şi Labroche (27) aduc date asupra acţiunii terapeutice a $N_1—N_1$ anhidrobis (β -hidroxietil) biguanidei (1022 J.D. sau ABOD) în cîteva dermatoze, între care şi cea herpetică.

În eczema variceliformă Kaposi, unde datorită leziunilor cutanate întinse copilul pierde o cantitate mare de apă, proteine şi electroliţi, terapia parenterală care să compenseze aceste pierderi este absolut necesară. Leziunea cutanată va fi în mod special îngrijită, prin aplicarea dezinfectantelor uşoare şi a antibioticelor cu scopul prevenirii infecţiilor bacteriene secundare. În cazul apariţiei simptomelor nervoase, administrarea gamaglobulinelor şi a hormonilor steroizi este absolut indicată.

În gingivo-stomatita herpetică toaleta bucală cu soluţii slabe de apă oxigenată, hipermanganat de potasiu etc. este necesară. În această formă de boală folosirea antibioticelor are indicaţie majoră în prevenirea infecţiilor bacteriene secundare care agravează leziunea herpetică.

În cazul gingivo-stomatitei herpetice la copil sau chiar la adult, leziunea fiind foarte dureroasă, împiedică alimentarea, aşa încît se recomandă anestezierea mucoasei pentru a uşura înghiţirea lichidelor şi alimentelor. În caz contrar, se vor administra parenteral soluţii saline cu scopul de a compensa pierderea electroliţilor.

Ramfjord (99) obţine rezultate terapeutice bune în gingivo-stomatita herpetică recidivantă prin utilizarea gama-globulinelor.

Cheever şi Daikos (18), studiind efectul protector al gama-globulinei administrate sub forma unei doze unice înainte, simultan sau la diverse

intervale de timp de la inocularea virusului intraperitoneal sau intracerebral la şoarece, obţin rezultate ce merită a fi reţinute.

La lotul de animale inoculate pe cale intracerebrală cu virus herpetic după 12—24 de ore de la administrarea intraperitoneală a gama-globulinei de origine umană, se obţine un efect protector evident; efectul a fost aproape similar şi la lotul de şoareci la care gama-globulina a fost administrată după 12 ore de la inocularea intracerebrală a animalelor; nici o acţiune protectoare nu a fost obţinută cînd gama-globulina a fost administrată la 24 de ore sau mai tîrziu după instituirea infecţiei.

Efectul protector cel mai eficace a fost observat la lotul de animale inoculate cu virus pe cale intraperitoneală. Gama-globulina injectată subcutanat cu 24 de ore înainte sau simultan infecţiei, a conferat animalelor o protecţie mult mai mare decît dacă ea este administrată la 24 sau 48 de ore după infecţie. Autorii consideră că acţiunea protectoare a gama-globulinei la acest lot de animale se datoreşte în mare măsură neutralizării virusului în afara sistemului nervos central.

Acţiunea protectoare a gama-globulinei este deci netă numai în cazul administrării ei înaintea instituirii infecţiei herpetice. Administrarea ei după 24 de ore de la infecţie are un efect protector redus şi aceasta numai în cazul cînd infecţia a fost instituită pe cale extraneurală.

În cazul infecţiei cerebrale, Cheever şi Daikos consideră că o fracţiune de gama-globuline, imunologic activă, în ciuda greutăţii sale moleculare mari, ar trece de la locul administrării ei (cavitatea peritoneală) în sistemul nervos central şi ar împiedica astfel propagarea virusului de la o celulă nervoasă la alta, ceea ce ar explica efectul protector observat.

Evans, Slavin şi Berry (33), în experienţa lor, ajung la aceeaşi concluzie, virusul fiind neutralizat de gama-globulină chiar în sistemul nervos. Lipsa de protecţie a gama-globulinei administrate 24 de ore după inocularea virusului este explicată de autori ca fiind datorită multiplicării rapide a virusului în creierul de şoarece.

Wheeler şi Huffines (131) administrînd gama-globulină la o gravidă cu herpes vulvo-vaginal, cu cîteva zile înainte de naştere, nu obţine nici o acţiune preventivă, fătul făcînd o infecţie herpetică generalizată, cu sfîrşit letal.

În meningo-encefalitele herpetice unii autori aplică tratamentul cu cortizon. Acţiunea sa este însă controversată. Boe, Solbert şi Saeter (12) constată după cortizon o mortalitate mai mare şi un număr mai ridicat de sechele la bolnavii cu meningo-encefalite acute, unele din ele de natură herpetică, decît la cei supuşi altor tratamente.

În tratamentele nevralgiei postherpetice s-au utilizat diverse mijloace terapeutice, însă rezultatele au fost nesatisfăcătoare. Sengal şi Gardner (109) aplică corticosteroizii în 30 de cazuri de nevralgie apărută la adulţii peste 50 de ani, între 4 luni şi 2 ani de la apariţia leziunii herpetice, fără să obţină vreun rezultat. Singură asocierea corticosteroizilor cu o injecţie locală de procaină ameliora pasager durerea.

Herpesul corneean, prin prognosticul său uneori nefavorabil, reprezintă o afecţiune delicată care trebuie tratată de oftalmolog. Dacă rezultatele sînt satisfăcătoare prin aplicarea iodului sau a eterului pe epiteliul corneean la începutul bolii, deci cînd leziunea herpetică este localizată strict epitelial, cu totul altul este prognosticul cu această terapeutică în leziunile herpetice recidivante care duc atît la atingerea membranei Bowman, cît şi a parenchimului corneean.

S-au încercat numeroase substanţe chimice, fără a se ajunge la un rezultat terapeutic satisfăcător.

Prin utilizarea acidului paraaminobenzoic în leziunile herpetice corneene la om, Roucher şi colab. (106) obţin rezultate bune în 12 cazuri. Instilat local, sub formă de colir 20%, la fiecare două ore timp de 3 zile, autorii constată reducerea simptomatologiei subiective, a duratei leziunii şi a cicatrizării sale.

Proprietăţile antivirotice ale agenţilor chimici au fost studiate şi de către Sery şi Furginele (110). Autorii obţin rezultate bune asupra virusului herpetic *simplex* folosind p-benzochinonă şi cîteva derivate ale sale obţinute pe căi biologice (fumigatin, spirulozin, phoenixin) şi cationi metalici (paladiu, argint, cadmiu, aur, mercur, bismut şi uraniu). Cele mai eficiente dintre acestea s-au dovedit a fi argintul şi mercurul.

Autorii consideră că instituirea unei badijonări corneene cu o soluţie de 0,5% nitrat de argint, la indivizi cu ulcer corneean dendritic ar putea fi folosită ca mijloc terapeutic.

Syromjatnikova şi Filkova (120) aplică P^{32} în tratamentul cheratitei herpetice şi al opacităţii corneene reziduale. Din 145 leziuni herpetice corneene tratate, autorii obţin 131 de vindecări, 9 ameliorări şi 5 eşecuri.

Surprinzător este faptul că aceşti autori obţin în 21 de cazuri cu opacitate corneeană reziduală diminuarea opacităţii şi ameliorarea acuităţii vizuale.

Aplicarea corticoterapiei în perioada de debut al herpesului corneean s-a dovedit nu numai ineficace, ci chiar periculoasă. Ea este urmată de multe ori de perforaţii corneene (123) sau chiar de determinări herpetice meningo-encefalitice. Cercetările efectuate de Ormsby şi colab. (94) în cheratita experimentală la iepure au demonstrat de altfel că sub acţiunea cortizonului leziunile se agravează.

Numărul cel mai mare de complicaţii la om s-ar datora, după autori, acţiunii inhibitorii a acestor hormoni asupra formării locale a anticorpilor.

Corticosteroizii îşi au indicaţie numai la sfîrşitul perioadei de stare a bolii şi în asociere cu antibiotice cu spectru larg de acţiune.

Deşi din punct de vedere experimental, gama-globulinele s-au dovedit a avea oarecare eficacitate, ele sînt socotite de majoritatea autorilor ca ineficace în cheratita umană atît în aplicări locale (instilaţii), cît şi administrate pe cale generală.

Scanned with OKEN Scanner

În ultimul timp, Cuccagua, Damiani şi Bonamour (22) au aplicat în herpesul corneean gama-globulina specifică, fie în instilaţii, fie injectată subconjunctival, obţinînd rezultate încurajatoare în ceea ce priveşte ameliorarea clinică şi scurtarea evoluţiei sale. În formele de cheratită profundă administrarea gama-globulinei permite instituirea precoce a unei corticoterapii locale cu riscuri mult mai mici ale eventualelor complicaţii nervoase.

Clark, Baldone şi Thomas (20), studiind acţiunea neurotoxinei I a lui Sanders (venin de şarpe modificat) în herpesul recidivant al corneei, obţin rezultate încurajatoare. După autori, acest venin de şarpe ar acţiona ca un agent antiinflamator nespecific şi ca un stimulator al formării de anticorpi.

Deşi mulţi autori italieni au adus date asupra eficacităţii lizozimului în cheratita herpetică umană, considerînd acest produs ca primul medicament antiviral, Verdi şi Serra (128), cercetînd acţiunea acestui produs în culturi de celule şi Nicolau şi Drăgănescu la iepurele infectat experimental, nu obţin nici un efect inhibitor asupra evoluţiei infecţiei herpetice.

Tot în cheratita herpetică umană, Rivara (104) utilizează două substanţe antivirale, xenalamina şi xenalazona, însă cu rezultate nu mult deosebite de cele obţinute prin tratamentul clasic al badijonării locale cu tinctură de iod şi antibiotice pe cale generală. După autor, folosirea xenalaminei şi xenalazonei ar duce însă la rărirea recidivelor herpetice cornene.

Aceleaşi rezultate le obţin şi Rey, Guerin, Baylet şi Armengaud (102) în leziunea herpetică primară prin aplicarea virostatului, xenalaminei şi hidroclorothiazidei.

În cazurile de cheratită metaherpetică gravă, grefele de cornee au dus la rezultate satisfăcătoare.

Indiferent de terapeutica aplicată, mai mult sau mai puţin specifică, sînt absolut indicate atît vitaminele din grupul complexului B, şi în special vitamina B_1, B_2 şi B_{12}, cît şi vitamina C.

S-a demonstrat atît *in vitro* cît şi *in vivo* că vitamina C favorizează formarea anticorpilor, ajută la detoxifierea generală a organismului, modifică permeabilitatea celulară, stimulează funcţia suprarenală şi secreţiile hormonale, aşa încît instituirea ei îşi are indicaţie majoră şi în infecţia herpetică.

2. ACŢIUNEA TERAPEUTICĂ A ANTIMETABOLIŢILOR

Este bine ştiut faptul că ADN-ul viral conţine acid fosforic, un zahăr de tipul dezoxiriboză şi 4 baze azotate, două purinice (adenina şi guanina) şi două pirimidinice (timina şi citozina).

Cunoaşterea compoziţiei sale a dus în ultimul timp la studierea unor substanţe care interferează cu formarea purinelor şi pirimidinelor şi cu

metabolismul lor celular. Dunn şi Smith (28) şi Zamenhof şi Griboff (132) au demnonstrat că încorporarea bromului interferă cu sinteza şi utilizarea timinei din ADN-ul bacterian. Un efect similar a fost observat şi prin încorporarea clorului şi iodului.

Kriss şi Révesz (71) şi Kit, Dubbs, Piekarski şi Hsu (69) au demonstrat că inhibarea competitivă a 5-bromo-dezoxiuridinei intervine la nivelul timidinkinazei.

Cercetările lui Siminoff (111) au arătat că această substanţă, în concentraţie de 10^{-5} M, inhibă apariţia virusului infectant în celulele HeLa, cu condiţia ca ea să fie adăugată aproximativ la 2 ore de la infecţie ; autorul constată însă că adăugarea timidinei la 2 ore de la expunerea celulelor infectate la 5-bromo-dezoxiuridină duce la apariţia virusului.

Colorînd cu acridin-orange preparatele de culturi celulare infectate şi tratate cu 5-bromo-dezoxiuridină, autorul constată în nucleu prezenţa de incluzii ce conţin ADN.

Numeroşi autori (132) (30) (47) (26) (28) (76) (29) (98) (63) au stabilit că pirimidinele nucleozide (5-iodo-2-dezoxiuridina şi 1-β-D-arabinofurnozilcitozina sau citarabina) se încorporează în ADN.

a. *5-iodo-2-dezoxiuridina* (*I.D.U.*). Welch şi Prusoff (130) au demonstrat că 5-iodo-dezoxiuridina inhibă sinteza dezoxitimidinei şi este preluată în ADN ca iododezoxiuridină-5-fosfat în loc de timidină-5-fosfat. Apare deci un ADN anormal care nu poate sinteza virusul infectant.

Hermann (52) demonstrează că 5-iodo-2-dezoxiuridina are proprietatea de a inhiba formarea plajelor de virus herpetic în culturi embrionare de găină.

Odată cu această descoperire s-a trecut de la terapia cu antibiotice şi substanţe chimice, la aceea cu antimetaboliţi de tipul 5-iodo-2-dezoxiuridinei. Substanţa a fost aplicată deocamdată în tratamentul leziunilor herpetice corneene şi cutanate.

Kaufman (64) a fost acela care au dovedit că această substanţă are acţiune terapeutică în cheratita herpetică experimentală a iepurelui. Aplicînd tratamentul imediat după inocularea virusului sub formă de instilaţii din soluţia de 0,1%, autorul obţine, la 75% din iepurii trataţi, prevenirea ulceraţiilor dendritice, iar în restul de 25% o limitare a extinderii leziunii corneene ; el constată de asemenea că administrarea iododezoxiuridinei la 48 de ore de la infecţie, deci în momentul cînd leziunea corneeană este deja constituită, dă rezultate bune.

Ulterior, Kaufman şi colab. (65) (66) (67) şi Blattner (11), Thiel şi Wacker (121) Gordon şi colab. (44), Maxwell (83), Havener şi colab. (51) etc. obţin aceleaşi efecte şi în cheratită herpetică umană.

După Lunth, Mac Callum (77) şi Burns (16) nu ar exista totuşi nici o deosebire între efectul produs de iodo-dezoxiuridină şi alte metode clasice de tratament ; astfel, din cei 22 de bolnavi cu ulcer dendritic, 11 trataţi

Scanned with OKEN Scanner

cu iodo-dezoxiuridină şi 11 cu neomicină, Lunth şi Mc Callum nu obţin nici un avantaj terapeutic al iodo-dezoxiuridinei asupra neomicinei.

Nici Bianchetti şi Witmer (10) şi Riem (103) nu constată vreo diferenţă între efectul terapeutic obţinut cu iodo-dezoxiuridină şi cu alte metode de tratament (badijonări cu iod, debridări ale epiteliului corneean). Riem constată chiar o frecvenţă mai mare a recidivelor după aplicarea iodo-dezoxiuridinei.

După Mac Kenzie (82), în ulcerul dendritic, carbolizarea ar fi chiar mult mai eficace decît iodo-dezoxiuridina.

Evident că obţinerea unui rezultat terapeutic este în strînsă relaţie cu tipul leziunii şi cu momentul aplicării tratamentului.

Cercetările lui Leopold (75) au arătat că leziunile herpetice corneene superficiale beneficiază în mod evident de tratamentul cu iodo-dezoxiuridină, în timp ce leziunile stromale nu sînt influenţate de această substanţă.

Jawetz şi colab. (59), Ey şi colab. (35), Engle şi Stewart (32) aduc date în ceea ce priveşte titrul virusului din epiteliul corneean după tratamentul cu iodo-dezoxiuridină. Ei constată că acestă substanţă, pe lîngă reducerea titrului virusului, are o netă acţiune favorabilă asupra evoluţiei leziunii corneene.

Underwood, Elliott şi Buthala (126) studiază patogenia cheratitei herpetice a iepurelui sub acţiunea iodo-dezoxiuridinei. Autorii folosesc o concentraţie de 0,1% de iodo-dezoxiuridină, soluţie pe care o administrează prin instilaţii repetate (18 ori pe zi timp de 10 zile) începînd de la 24 de ore de la inocularea virusului. Rezultatele terapiei au fost verificate de autori prin examene oftalmologice, lampa cu fantă şi prin studii histopatologice şi izolări de virus (studiul titrului virusului din epiteliul corneean, iris şi lichidul camerei anterioare a ochiului). Autorii conchid că iodo-dezoxiuridina are o acţiune netă antivirală, evoluţia leziunii fiind oprită. În încercările de izolare a virusului autorii au arătat că multiplicarea virusului este împiedicată de către această substanţă. Puţinele izolări din epiteliul corneean şi iris, în special după tratamentul îndelungat, ar pleda, după autori, asupra unei rezistenţe dobîndite de virus faţă de această substanţă, fapt de altfel semnalat anterior şi de Underwood (125), Underwood şi colab. (127), Smith (112) şi Buthala (17).

Datele obţinute în infecţia corneeană recidivantă sînt încă neconcludente.

Hart şi colab. (50), deşi au urmărit cazurile lor o perioadă scurtă de timp, observă totuşi mai puţine recidive la cazurile tratate cu iodo-dezoxiuridină.

S-a arătat însă de către Ey şi colab. (34) (35) că virusul herpetic poate totuşi fi cultivat din corneea tratată cu iodo-dezoxiuridină; aceasta denotă că iododezoxiuridina nu distruge complet virusul. Faptul a fost confirmat de Leopold (75) şi de Smith şi Dukes (113). Ei constată că iodo-dezoxiuridina are proprietatea de a împiedica formarea noului virus infec-

Scanned with OKEN Scanner

tant, fără a preveni sinteza componenţilor virali noi. În culturile infectate şi tratate cu iodo-dezoxiuridină, Smith şi Dukes pun în evidenţă cu ajutorul microscopului electronic prezenţa de capsomere şi de mate-

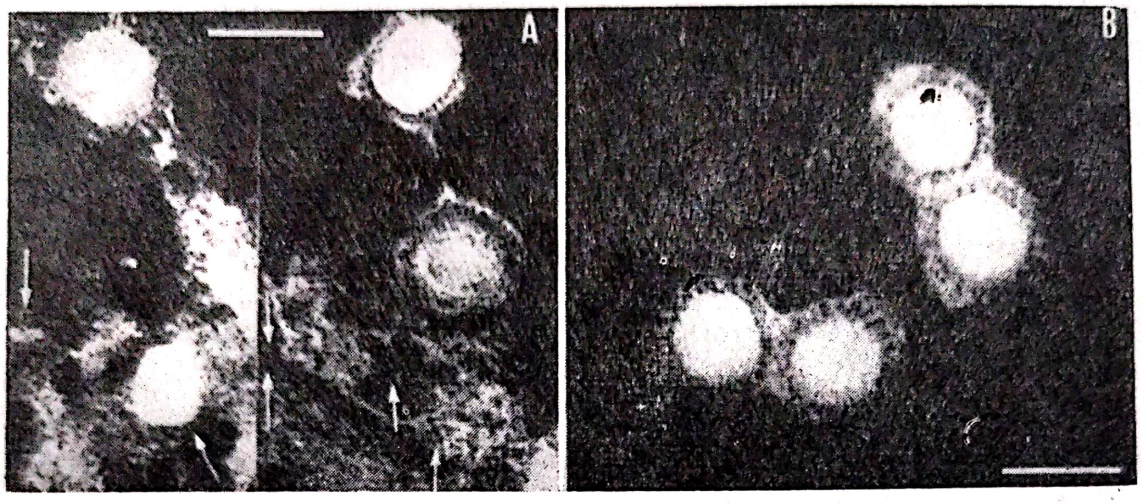


Fig.108.—Acţiunea *in vitro* a 5-iodo-2-dezoxiuridinei asupra virusului herpetic. În *A*, aspectul particulelor de virus după tratare cu 5-iodo-2-dezoxiuridină; în *B*, aspectul particulelor de virus în culturile netratate cu 5-iodo-2-dezoxiuridină. Smith şi Dukes, 1964.

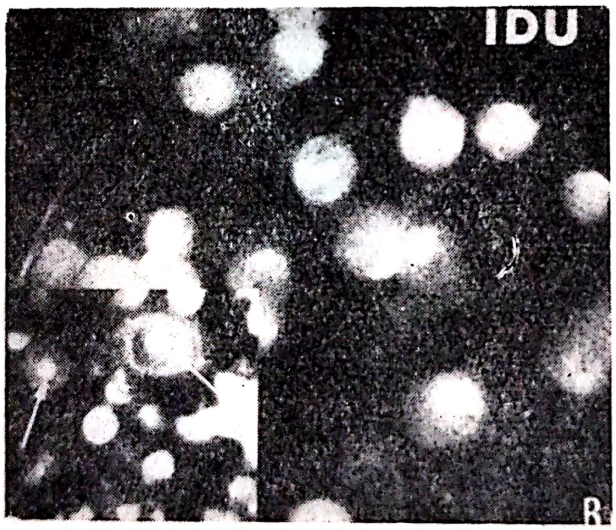


Fig. 109. — Celule infectate cu virus herpetic şi tratate cu 5-iodo-2-dezoxiuridină; se observă cu ajutorul coloraţiei cu anticorpi fluorescenţi prezenţa de incluzii intranucleare. Smith şi Dukes, 1964.

rial filamentos, probabil ADN (fig. 108), iar prin colorarea cu acridin-orange şi imunofluorescenţă, prezenţa în nuclei a unor formaţiuni asemănătoare incluziilor din celulele netratate (fig. 109). Pe preparatele lor, Smith

Scanned with OKEN Scanner

şi Duckes nu observă nici un corpuscul cu înveliş, ci numai prezenţa de particule virale cu aspect zdrenţuit, cu centrul gol, imperfecte din punct de vedere structural, fapt ce determină pe autori să considere că iodo-dezoxiuridina acţionează asupra cuplării componenţilor virali şi nu asupra producerii acestor componenţi.

Aplicarea unei terapii de durată mai lungă ar reduce după Graeber (45) numărul recidivelor, însă nu le-ar suprima. Singurul inconvenient al unei terapii prelungite ar fi, după Laibson şi colab. (72), Kaufman şi Maloney (66), Underwood şi colab. (127) şi Kobayashi şi Nakamura (62), că virusul din corneea tratată devine rezistent la iodo-dezoxiuridină.

Hall-Smith, Corrigan şi Gilkes (48), Schofield (108), Jackson (58), Burnett şi Katz (15), Juel-Jensen şi Mac Callum (60) (61), Ive (57) au abordat o serie de cercetări asupra acţiunii acestei substanţe în herpesul cutanat, rezultatele, la ora actuală, fiind însă neconcordante.

Astfel, Hall-Smith, Corrigan şi Gilkes (48), aplicînd iodo-dezoxiuridina, sub forma unei soluţii 0,1% sau a unei pomezi 0,5%, la bolnavi cu leziuni cutanate de herpes *simplex*, obţin unele rezultate încurajatoare.

Burnett şi Kats (15), studiind acţiunea substanţei pe 28 de cazuri cu leziuni herpetice cutanate, nu obţin însă nici o vindecare. La aceleaşi rezultate ajung şi Ive (57) şi Key (68). Mac Callum (79) însă semnalează eficacitatea substanţei în herpesul cutanat.

Cercetările diverşilor autori au stabilit că 5-iodo-dezoxiuridina are efect în herpesul cutanat numai atunci cînd substanţa este folosită într-o concentraţie anumită, iar aplicarea ei se face într-o anumită perioadă a ciclului de multiplicare a virusului.

Force, Stewart şi Haff (37) constată, în infecţia herpetică cutanată la iepure, că cea mai mare concentraţie de virus se găseşte la 4—5 zile de la inoculare, deci cînd leziunea cutanată este maximă. Dacă la 6 ore de la inocularea virusului se administrează subcutan 125 mg/kg corp de iodo-dezoxiuridină, la fiecare 8 ore timp de 5 zile, se obţine o prevenire a apariţiei infecţiei herpetice; după autori prevenirea infecţiei s-ar datora unei acţiuni inhibitorii asupra multiplicării virusului.

Alţi autori au arătat că eficacitatea tratamentului în herpesul cutanat depinde de substanţa în care este încorporată 5-iodo-dezoxiuridina.

Plecînd de la un fapt bine stabilit de Stoughton şi Fritsch (117), că dimetilsulfoxidul (DMSO) favorizează absorbţia percutană a unor substanţe aplicate cu scop terapeutic, Goldman şi Kitzmiller (43) încorporează 5-iodo-2-dezoxiuridina în această substanţă (1% iodo-dezoxiuridină în 90% DMSO) şi folosesc amestecul în aplicaţii locale la 7 indivizi cu leziuni herpetice cutanate grave cu rezultate foarte bune.

Mac Callum şi Juel-Jensen (80) obţin de asemenea rezultate excelente la 21 de bolnavi cu leziuni herpetice cutanate folosind 5% iodo-dezoxiuridina în DMSO.

Corbett şi colab. (21) folosesc de asemenea cu rezultate bune o soluţie de 0,1% iodo-dezoxiuridină în 1,4% alcool polivinilic.

Scanned with OKEN Scanner

b. *5-bromo-dezoxiuridina* (BDU). S-a demonstrat că 5-bromo-dezoxiuridina are acţiune terapeutică în cheratita herpetică. Siminoff (111), studiind acţiunea ei asupra virusului herpetic cultivat în celule HeLa, ajunge la concluzia că acest compus împiedică multiplicarea virusului prin acţiunea sa inhibitorie asupra sintezei ADN.

c. *1-β-D-arabinofuranozilcitozina* (*citarabina*). Underwood (124) şi Buthala (17) demonstrează, în culturi celulare inoculate cu virus herpetic şi la iepurele cu cheratită experimentală, acţiunea inhibitorie a citozin-arabinozinei asupra virusului, iar Kaufman şi colab. (67) verifică eficacitatea sa terapeutică în cheratita herpetică umană.

Studiind din punct de vedere clinic, histopatologic şi virusologic evoluţia cheratitei experimentale la iepurele tratat cu 1-β-D-arabinofuranozilcitozina, Underwood, Elliot şi Buthala (126) obţin rezultate identice ca şi cu iodo-dezoxiuridina, acţiunea antivirală a substanţei fiind netă.

Underwood, Wisner şi Weed (127) au demonstrat că unele tulpini de virus herpetic, rezistente la iodo-dezoxiuridină, sînt sensibile la acţiunea citozin-arabinozinei, însă dozele terapeutice folosite duc la alteraţii corneene.

La fel, Leopold (75) constată, la un număr din bolnavii trataţi, apariţia de ulceraţii corneene determinate de această substanţă.

d. *Tiosemicarbazone*. Plecînd de la rezultatele obţinute de Thomson, Minton, Officer şi Hitchings (122) că tiosemicarbazonele heterociclice şi monociclice au efect asupra infecţiei vaccinale la şoarece, Hutfield şi Csonka (55) încearcă această ultimă substanţă, astăzi cunoscută ca Marboran (1-metilizatin-3-tiosemicarbazonă), la bolnavi cu herpes genital, însă fără rezultate. Aceleaşi rezultate negative fuseseră de altfel obţinute şi de Bauer şi Sadler (5), în infecţia intracerebrală a şoarecelui cu virus herpetic.

Rao, McFadzean şi Squires (100) constată că M. şi B 7453 (3-metil-izotiazol-5-carboxal dehidtiosemicarbazona) şi M şi B7714 (4-bromo-3-metilisotiazol-5-carboxaldehidtiosemicarbazona), care sînt tot tiosemicarbazone monociclice, deşi au efect asupra infecţiei neurovaccinale la şoarece, sînt ineficace faţă de virusul herpetic.

e. *A. 10598*. De Long, Davis şi Cline (24) izolează din tulpina de *Streptomyces hygroscopicus* o substanţă cu acţiune antivirală pe care o denumesc A. 10598.

Fără a cunoaşte structura sa, autorii demonstrează că A. 10598 interferează cu sinteza sau cuplarea componentelor particulelor de virus.

La şoarecele infectat cu virus herpetic *simplex*, De Long, Boniece, Cline şi Johnson (23) dovedesc că spectrul de acţiune al acestei substanţe este similar cu acela al iodo-dezoxiuridinei şi citozin-arabinozinei.

Scanned with OKEN Scanner

Rămîne de văzut dacă substanţa are acţiune terapeutică în infecţia herpetică umană.

f. *Acţiunea comparativă a diverselor substanţe asupra infecţiei herpetice.* Ing şi colab. (56) şi Stow şi Jenkins (118) fac studii comparative între efectul iodo-dezoxiuridinei şi acela al α-chimotripsinei. Dacă primii autori obţin rezultate mult mai puţin bune cu α-chimotripsina faţă de iodo-dezoxiuridină, Stow şi Jenkins obţin rezultate net superioare cu α-chimotripsina.

Studii comparative efectuate de Rapp (101) au demonstrat că inhibiţia formării plajelor de virus se produce sub acţiunea iodo-dezoxiuridinei şi citozin-arabinozinei (1-β-D-arbinofuranozilcitozină hidroclorică), apariţia lor nefiind influenţată de N-metilizatintiosemicarbazona.

Kaufman (65),cercetînd comparativ acţiunea 5-iodo-2′-dezoxiuridinei (IDU), 5-bromo-2-dezoxiuridinei (BDU), citozin-arabinozinei (CA) şi tri-fluorotimidinei (F_3TdR) în cheratita experimentală, constată că prima din aceste substanţe folosită în concentraţie maximă necesară împiedicării multiplicării virusului este netoxică pentru epiteliul corneean în comparaţie cu citozin-arabinozina. Din punct de vedere terapeutic toate aceste 4 substanţe au determinat, în doze convenabile, răspunsuri similare.

IDU, BDU şi F_3TdR devin active printr-un proces de fosforilare sub acţiunea timidinkinazei.

BIBLIOGRAFIE

1. Anderson, S. G., Hamilton, J., Williams, S. — Austr. J. exp. Biol. Med. Sci., 1950, **28**, 579.
2. Anderson, W. A., Kilbourne, E. D. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1961, **107**, 518.
3. Andervont, H. B. — J. infect. Dis., 1929, **45**, 366.
4. Baldridge, G. D., Blank, H. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1949, **72**, 560.
5. Bauer, D. J., Sadler, P. W. — Brit. J. Pharmacol., 1960, **15**, 101.
6. Bedson, S. P. — Brit. J. exp. Path., 1931, **12**, 254.
7. Bedson, S. P., Craword, G. L. — Brit. J. exp. Path., 1927, **8**, 138.
8. Berry, G. A., Slavin, H. B. — J. exp. Med., 1943, **78**, 305.
9. Biberstein, Jessner — citat de Siegert R. în Die Viruskrankheiten des Menschen, Bieling R., Gsell O., ed. 6, Johann Ambrosius Barth/Verlag, Leipzig, 1964.
10. Bianchetti, N., Witmer, R. — Ophtalmology, 1964, **147**, 251.
11. Blattner, R. J. — J. Pediat. 1962, **61**, 792.
12. Boe, J., Solbert, C. D., Saeter, T. — Brit. med. J., 1965, **1**, 1094.
13. Buerk, M. S., Blank, H. — New Engl. J. Med., 1951, **244**, 670.
14. Burnet, F. M., Lush, D. — J. Path. Bact., 1939, **49**, 241.
15. Burnett, J. W., Katz, S. L. — J. invest. Derm., 1963, **40**, 7.
16. Burns, R. P. — Archs. Ophthal., Chicago, 1963, **70**, 381.
17. Buthala, D. A. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1964, **115**, 69.
18. Cheever, F. S., Daikos, G. — J. Immunol., 1950, **65**, 135.
19. Clara, P. — citat de Hruszek, H. — Dermatol. Z., 1933, **68**, 27.
20. Clark, W. B., Baldone, J. A., Thomas, C. J. — Sth. Med. J., 1962, **55**, 947.
21. Corbett, M. B., Sidell, C. M., Zimmerman, M. — J.A.M.A., 1966, **196**, 441.
22. Cuccagua, Damiani, Bonamour — Bull. Soc. Ophtal. France, 1959.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 6

IMUNITATE ŞI PARAIMUNITATE

IMUNITATE TISULARĂ

A. IMUNITATEA ANTIHERPETICĂ LA ANIMAL

Nu toţi iepurii inoculaţi pe cornee cu virus herpetic mor de encefalită consecutivă; unii din ei, după ce prezintă cherato-conjunctivita caracteristică, se vindecă şi nu mai reacţionează faţă de o nouă inoculare practicată pe aceeaşi cornee ca şi prima (83) (51) şi rezistă chiar la introducerea virusului activ în creier (12) (29) (76) (77). Animalul dobîndeşte astfel, cu ocazia unui prim proces infecţios corneean, o imunitate locală şi generală. Această stare refractară dobîndită este specifică; ea nu se manifestă faţă de o altă infecţie, fie ea vaccinală sau rabică.

Imunitatea corneeană este precoce (apare către a 15-a zi), se accentuează treptat şi după 60—100 de zile dispare progresiv (31) (29).

O tulpină „slabă" de virus vaccinează corneea contra tulpinilor slabe, însă nu faţă de tulpinile „puternice"; din contra, acestea din urmă vaccinează contra tuturor tulpinilor (75) (52).

Se poate afirma că introducerea virusului herpetic într-un ţesut receptiv antrenează nu numai imunizarea acestui ţesut ci şi a celorlalte sisteme celulare sensibile. Astfel, inocularea virusului pe o cornee determină o cheratită severă ce poate duce deseori la o vaccinare pasageră a corneei opuse (31).

Levaditi şi Nicolau (76), inoculînd virusul herpetic pe cornee sau piele la iepure, au demonstrat că corneea nu vaccinează solid pielea, pielea nu vaccinează corneea, în timp ce ambele şi în special prima vaccinează nevraxul.

În cercetările lor, Levaditi şi Nicolau (77) au dovedit că iepurii inoculaţi pe cale cutanată sau corneeană rezistă la inocularea de probă intracerebrală. „Starea refractară a unui segment extern al ectodermului, în special al corneei, provoacă o stare analogă segmentului intern, reprezentat prin porţiunea invaginată a acestui ectoderm, care este nevraxul".

Starea refractară poate fi obţinută şi prin inocularea sub dura-mater a diluţiilor convenabile de virus proaspăt; puţinii iepuri care supravieţuiesc se dovedesc rezistenţi la inoculări ulterioare practicate pe aceeaşi cale cu doze mari de virus.

Sistemul nervos se imunizează de asemenea prin inocularea virusului proaspăt pe cale tegumentară, pe mucoasa genitală sau în testicul. S-a arătat de către Perdrau (123) că iepurele inoculat intradermic cu o singură

doză de virus prezintă după 11 zile o stare de imunitate ce persistă peste 3 luni. Inoculările pe cale cutanată, subcutanată, intradermică, corneeană, intranazală, în conductul auditiv extern, intramusculară şi intravenoasă la iepure sînt urmate de o stare de imunitate care poate fi destul de accentuată şi animalul rezistă la inocularea de probă intracerebrală, sau ea este mai puţin accentuată şi animalul rezistă numai la reinocularea intradermică a virusului.

Inoculările vaccinante în creier, testicul sau pe tegumente nu duc totdeauna la imunizarea corneei.

S-a demonstrat de către Bedson şi Crawford (10) că la cobaiul inoculat intraplantar cu virus herpetic apare la 5 zile o stare de imunitate ce persistă pînă la 130 de zile.

Olitsky şi Long (115) obţin aceeaşi stare de imunitate prin inocularea virusului pe cale intraperitoneală, iar Bedson şi Bland (8) prin inoculări pe pielea scarificată urmate de o inoculare intramusculară.

Cercetările lui Teissier, Gastinel şi Reilly (150) au arătat că maimuţa inoculată de mai multe ori cu virus pe cale intradermică face o imunitate ce persistă cel puţin 4 luni.

După sacrificare, în nevraxul iepurelui imunizat, se descoperă deseori leziuni cronice caracteristice, denumite de Levaditi şi Nicolau (76), „leziuni de imunitate", care atestă starea refractară consecutivă acţiunii directe a virusului asupra ţesuturilor.

Imunitatea se instalează deci în organism în urma bolii aparente sau inaparente; ea nu poate fi niciodată produsă prin introducerea în organismul iepurelui a virusului omorît (38). Inocularea la un singur iepure a unei cantităţi enorme de emulsie de virus omorît, obţinută din trei creieri întregi de iepure, nu a reuşit să imunizeze animalul (90).

S-a arătat de către Nicolau şi Kopciowska (101), Urbain şi Schaefer (155) şi Bedson (7) că virusul herpetic convenabil formolat (formol $2^0/_{00}$) poate însă imuniza cobaiul. La aceleaşi concluzii ajung şi Anderson şi Kilbourne (3). Administrînd la şoarece pe cale intravenoasă sau intraperitoneală virus herpetic cultivat pe celule renale de iepure şi inactivat cu ajutorul razelor ultraviolete se obţine la animal o rezistenţă solidă faţă de inocularea de probă intracerebrală cu 1000 LD_{50}. Andervont (4) şi Kanazawa (68), injectînd şoareci cu virus herpetic fenolat pe cale intraperitoneală, intracerebrală sau cutanată, obţin o imunitate solidă faţă de acest virus. Aceeaşi stare de imunitate au obţinut-o Burnet şi Lush (20) prin inocularea fie a virusului viu pe cale intranazală, fie a virusului formolat pe cale intraperitoneală. Aceşti autori au arătat că la şoarecii inoculaţi intracerebral cu o tulpină de herpes *simplex* cu virulenţă mică se instalează o stare de imunitate solidă dată de inocularea pe aceeaşi cale a unei tulpini herpetice foarte virulente, anticorpii serici fiind în titru mic.

Cu aceeaşi ocazie autorii constată că la 14 zile de la inocularea intranazală a unei tulpini encefalitogene de herpes, şoarecele este complet imun faţă de inocularea intracerebrală a aceleeaşi tulpini de virus.

Autorii nu au testat însă anticorpii pentru a vedea dacă această stare de imunitate ţine sau nu de prezenţa lor în sînge.

Experienţele lui Levaditi şi Nicolau (77) au dovedit că serul unor animale imunizate contra herpesului poate fi lipsit de acţiune virulicidă *in vitro*. Din contra, amestecul *in vitro*, în condiţii determinate, a unei emulsii de creier provenit de la un iepure vaccinat cu mai multe doze mortale de virus, se arată total lipsit de activitate patogenă, chiar prin inoculare intracerebrală. Aceste rezultate i-au determinat pe autori să considere că în imunitate intervine atît factorul umoral cît şi cel tisular, primul nefăcînd altceva decît să se adauge celui de-al doilea, imunitatea tisulară fiind aceea care joacă rol esenţial.

La animalul imunizat, ţesutul devenit refractar este insensibil la o nouă inoculare cu acelaşi germene. Insensibilitatea se manifestă în două feluri: pe de o parte ţesutul vaccinat distruge virusul cu o rapiditate surprinzătoare atît *in vitro* (77), cît şi *in vivo* (101), iar pe de altă parte, încetează să mai reacţioneze prin alteraţii histologice caracteristice, la toate atacurile noi ale germenului inframicrobian.

Rezultatele experimentale ale lui Nicolau şi Kopciowska, prezentate în figura 110, demonstrează că virusul herpetic inoculat sub dura-mater la iepurii vaccinaţi nu poate supravieţui în contact cu ţesutul imunizat decît un timp foarte scurt, el nemaiputînd fi găsit după 2 ore de la inoculare.

În cercetările lor, Levaditi şi Nicolau (77), Zinsser şi Tang (160), Teissier şi colab. (152), Urbain şi Schaefer (155), demonstrează că virusul herpetic este distrus *in vitro* de către creierul de iepure imunizat.

Teissier, Gastinel şi Reilly (152) constată în plus că suprarenala iepurilor deveniţi refractari după boala experimentală posedă aceeaşi proprietate de a neutraliza virusul.

În cercetări similare Perdrau (122) arată însă că creierul de iepure imunizat nu numai că nu are *in vitro* acţiune neutralizantă asupra virusului, ci chiar îi măreşte puterea patogenă. Amestecul de creier imun, după prealabila menţinere în glicerină, cu virusul herpetic proaspăt inoculat intracerebral la iepure determină fenomene de encefalită herpetică după o perioadă de incubaţie foarte scurtă; prin glicerinarea creierului imun, apar „agresine" care, după autor, nu pot acţiona cînd acesta este în stare proaspătă.

Stroian (145), folosind reacţia de fixare a complementului în detectarea anticorpilor în ţesuturile iepurilor solid imunizaţi împotriva virusului herpetic, demonstrează, cu atît mai mult cu cît serul acestor animale dădea rezultate negative, că anticorpii sînt prezenţi în ordine cantitativ descrescîndă în creier, capsule suprarenale, ovar, testicul; ei au fost găsiţi în mică cantitate în splină şi măduva osoasă şi erau absenţi în ser.

Toate aceste experienţe dovedesc că în ţesuturile care intră în conflict cu virusul se găsesc anticorpi antivirotici.

a. *Neuroinfecţii autosterilizate.* În cursul experienţelor făcute pe iepure cu virusul herpetic, anumite animale mor mai tîrziu decît de obicei;

Scanned with OKEN Scanner

se constată că virusul nu mai există în sistemul nervos unde se găsesc însă grave leziuni histologice. Primele cazuri de acest fel au fost semnalate în 1922 de Nicolau şi Poincloux (106). Mai tîrziu, studiate în număr mai mare (77) (78) (79) (80) (82), ele au primit denumirea sugestivă de „neuro-

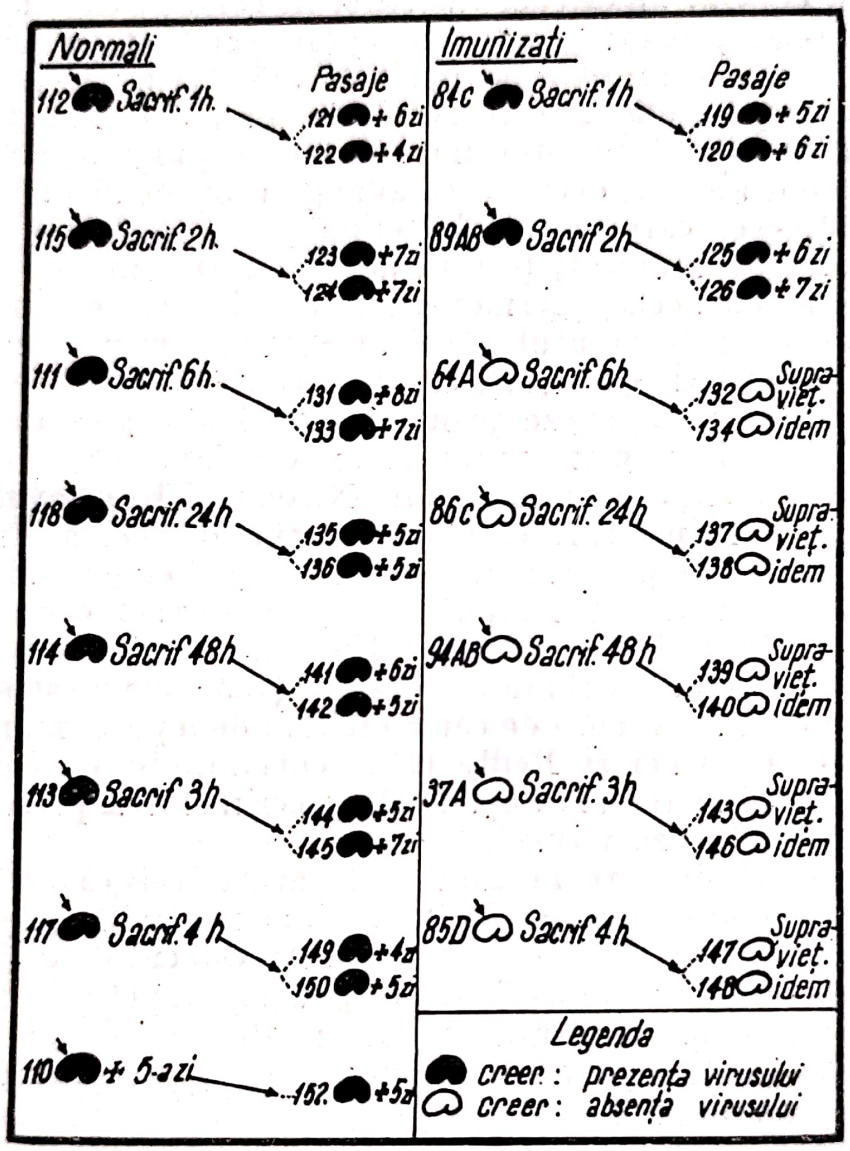


Fig. 110. — Schemă ce arată dispariţia virusului herpetic inoculat în creierul iepurilor imunizaţi antiherpetic. Nicolau şi Kopciowska, 1929.

infecţii mortale autosterilizate". Aceste cazuri sînt însă excepţionale, deoarece în general infecţia herpetică omoară animalul după o anumită perioadă de timp, iar virusul este găsit din abundenţă în nevrax. Dacă animalul supravieţuieşte maladiei, el devine imun şi se arată refractar la inocularea de probă. Dacă este sacrificat, animalul prezintă în nevrax leziuni histologice de acelaşi ordin cu al animalelor ce sucombă în urma „neuroinfecţiei autosterilizate". În encefal, aceste alteraţii pot prezenta aspecte de perforaţie ce comportă distrugeri masive în scoarţa temporală

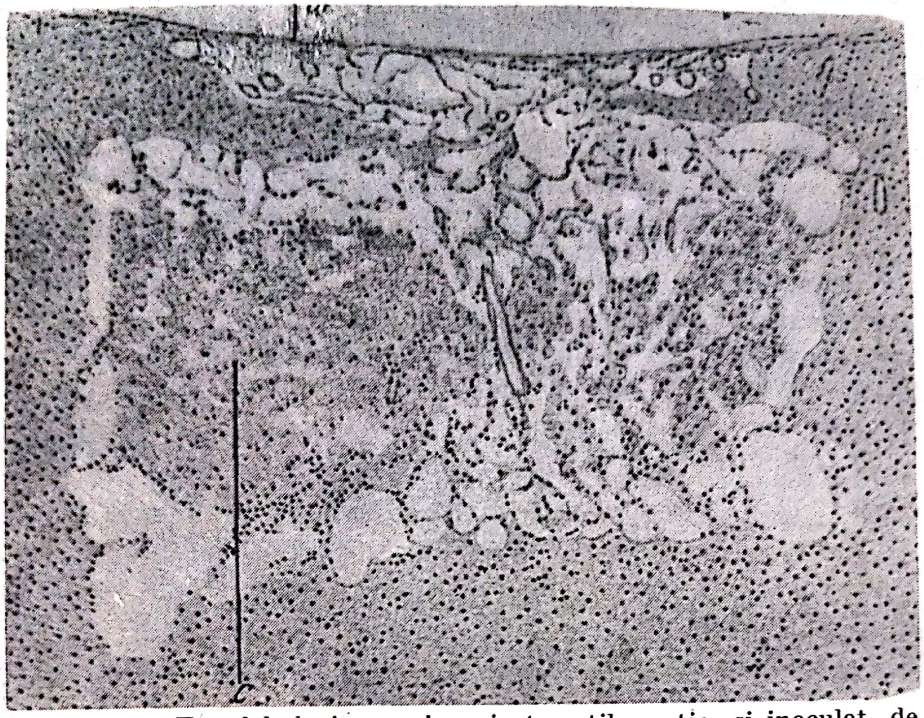


Fig. 111. — Encefal de iepure imunizat antiherpetic şi inoculat de probă pe cale intracerebrală. Animalul a fost sacrificat într-o foarte bună stare de sănătate aparentă. În scoarţa temporală superioară se constată o zonă a parenchimului distrusă şi transformată într-o cavitate (*c*) care este umplută cu celule gliale degenerate (corpi granulo-adipoşi Rio-Hortega); în *m*, meninge.

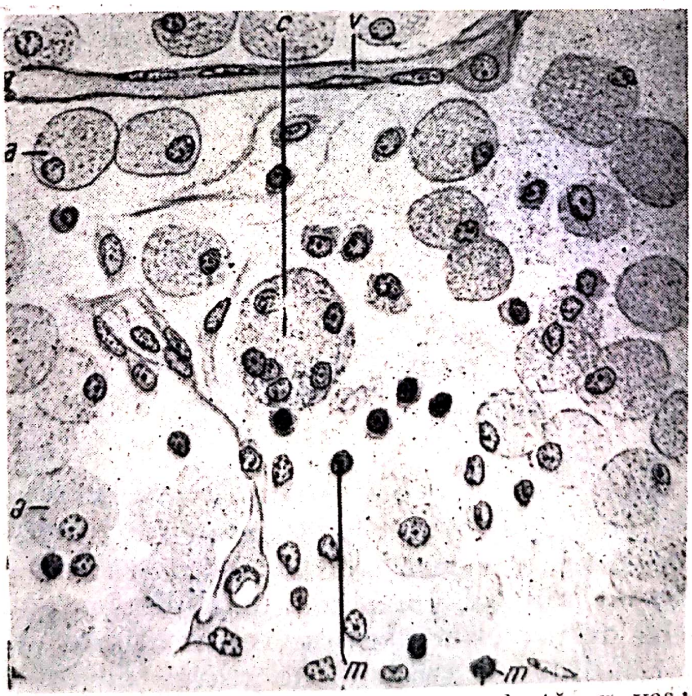


Fig. 112. — Detaliu din figura precedentă; *v*, vas; *a*, corpi granulo-adipoşi; *c*, celulă gigantă cu mai mulţi nuclei; *m*, mononucleare. Aceste elemente umplu cavitatea din fig. 111.

Scanned with OKEN Scanner

(fig. 111 şi 112) la toate nivelele, în lobii piriformi (fig. 113), în cornul lui Ammon (fig. 114) (100).

Se poate trage concluzia că *orice animal care a dobîndit starea refractară împotriva virusului herpetic a suferit o neuroinfecţie care s-a „autosteri-*

Fig. 113. — Corn Ammon de iepure imunizat cu mult timp înainte antiherpetic şi sacrificat în perioadă bună de aparentă stare de sănătate. O parte din rîndul de celule ganglionare sînt complet distruse (*d*), ţesutul cerebral fiind foarte rarefiat la acest nivel însă cu prezenţa de rari celule granulo-adipoase. În *c*, celule ganglionare normale.

lizat", *imunizîndu-l astfel* (97). „Autosterilizările mortale" pot fi considerate drept „imunizări nereuşite" : „ţesutul nervos poate învinge uneori virusul (se sterilizează) printr-o luptă care se caracterizează din punct de vedere morfologic prin alteraţii histologice incompatibile cu viaţa animalului". În speţă, ar fi vorba despre „accidente excepţionale în etapele proceselor succesive care au tendinţa să transforme starea de infecţie în stare de imunizare în organismul animal" (94).

În domeniul herpesului şi în aceste condiţii, cazurile de „neuroinfecţii autosterilizate mortale" (Levaditi) constituie excepţii de la regula

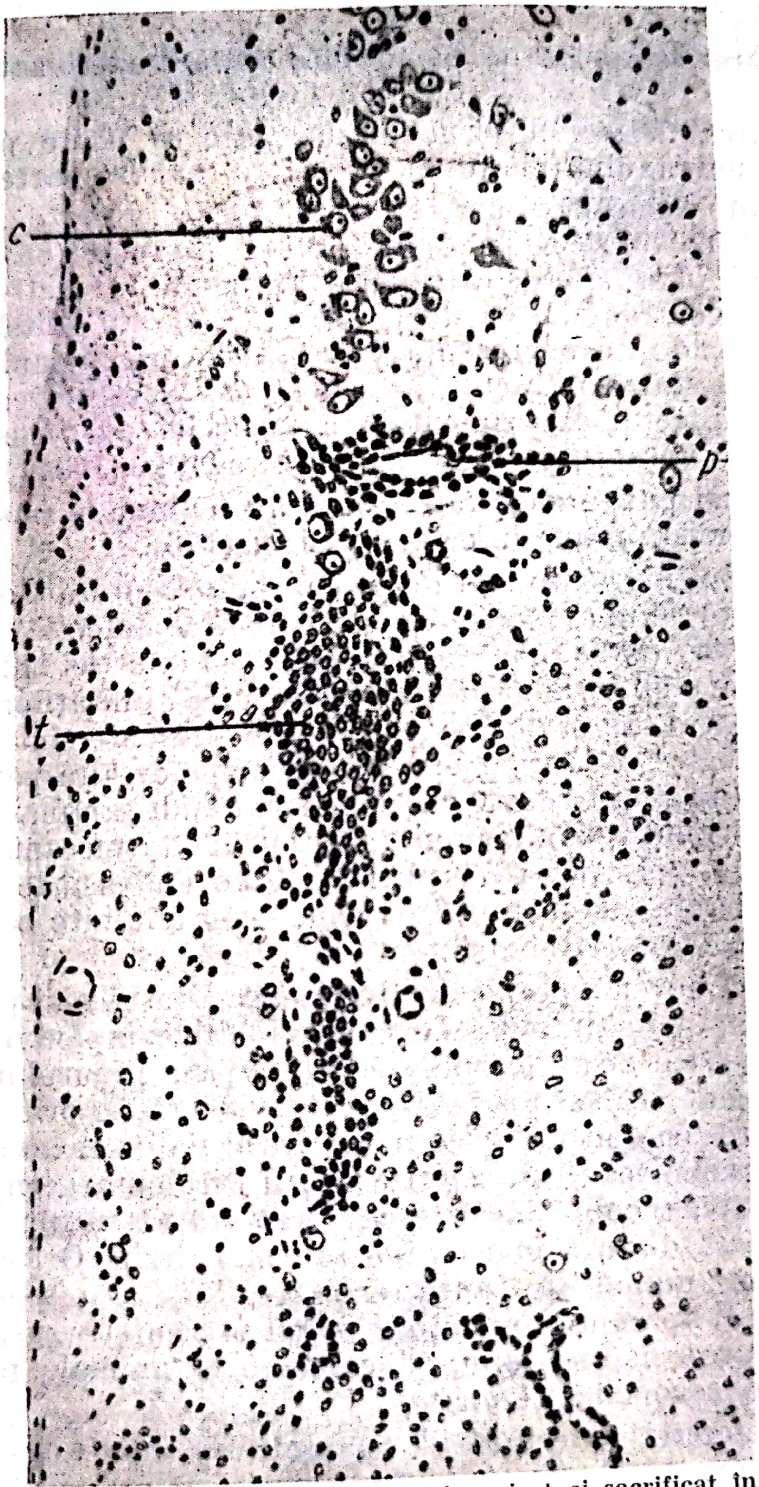


Fig. 114. — Encefal de iepure imunizat și sacrificat în bună stare de sănătate; lobul piriform (zona electivă). Se constată, că pe o oarecare porțiune, rîndul de celule ganglionare este distrus și înlocuit cu un țesut cicatriceal format din fibrobalste și celule pigmentofore. În *c*, celule ganglionare; în *p*, proces cronic de perivascularită; în *l*, țesut cicatriceal ce înlocuiește rîndul de neuroni distruși.

Scanned with OKEN Scanner

imunizării care comportă o „neuroinfecţie autosterilizată nemortală" (Nicolau).

Sterilizarea *in situ* a virusului herpetic se poate produce numai într-o parte a nevraxului (măduvă), excluzînd cealaltă parte (104).

În anumite cazuri de „autosterilizare" s-a constatat de Perdrau (123), Lépine (71), Nicolau şi Kopciowska (103), Magrassi (85) (86) (87), că virusul neutralizat *in situ* de către anticorpi poate fi reactivat cu ajutorul glicerinei şi, în contradicţie cu unele afirmaţii ale lui Olitski, Rhoades şi Long (116) care admiteau prezenţa virusului în organismul imunizat atît timp cît durează starea refractară, s-a demonstrat că starea de imunitate stabilită după infecţia experimentală a iepurelui cu virus herpetic *este incompatibilă cu supravieţuirea* germenilor în nevrax (103) (105).

Nu este mai puţin adevărat că la puţine animale *imunizate parţial*, virusul poate persista mult timp în organism (123).

Dacă virusul nu poate trăi în ţesutul bine imunizat, el însă poate fi găsit uneori în nevraxul animalelor moarte de neuroinfecţia autosterilizată. Nicolau şi Galloway (99) explică acest moment al infecţiei în felul următor :

„Ţesutul sensibil invadat de virus în virtutea afinităţilor sale elective, se apără ; rezultatul luptei dintre aceste două elemente sînt, pe de o parte alteraţiile histologice ce iau naştere pe loc, iar pe de altă parte, rezistenţa ce o capătă ţesutul şi consecutiv dispariţia mai mult sau mai puţin totală a germenilor. Multiplicarea virusului fiind oprită de mecanismele apărării generale şi locale, majoritatea germenilor fiind distruşi de această luptă, mai rămîn, probabil, cîteva unităţi virulente în anumite celule ce nu au reuşit să capete o stare refractară parţială".

„În terenul devenit propice culturii sale, virusul mai putea poate să vegeteze cîtva timp în simbioză cu rare celule incomplet imunizate, însă ţinut în eşec şi mascat de anticorpii prezenţi în ţesut în jurul lui. E probabil că în acest moment virusul poate fi pus în evidenţă fie prin electroforeză, fie prin reactivarea cu ajutorul glicerinei. Care ar fi durata acestei perioade ? Nu ştim, dar credem că e tranzitorie ; dacă virulenţa germenilor creşte, asistăm la o recidivă a bolii ; dacă starea refractară a ţesutului se intensifică, germenii trebuie să dispară mai curînd sau mai tîrziu. Ori cum ar fi, noi vrem să arătăm numai că „autosterilizarea" *in situ* a unui germene neurotrop poate fi aparentă numai, iar testul prezenţei virusului reprezentat prin inocularea materialului de cercetat la animale noi poate da rezultate ce duc la concluzii eronate".

Analogia acestei „sterilizări" aparente *in situ* este completă cu neutralizarea aparentă *in vitro* cu ajutorul anticorpilor „virulicizi".

Şi într-un caz şi în altul, se poate recupera virusul activ din complexe, aparent neutralizate, din antigen + anticorpi.

Reactivarea virusului herpetic *in vivo* a fost obţinută de Gastinel şi Reilly (44), care au determinat „trezirea" unei infecţii herpetice experimentale la animal, infecţie ce părea stinsă de vreme îndelungată.

Scanned with OKEN Scanner

b. *Rezistenţa activă faţă de superinfecţie* (fenomenul lui Magrassi). Acest fenomen a fost pus în evidenţă în 1935 de către Magrassi (85) (86) (87) şi studiat ulterior de Doerr şi Seidenberg (30), Doerr şi Hallauer (27), Hallauer (53) şi de Doerr şi Kon (28).

El constă din faptul că dacă se face o inoculare intracerebrală la iepure cu virus herpetic, cîteva zile după ce animalul fusese inoculat cu acelaşi virus pe cale corneeană sau tegumentară, boala aparentă nu se mai produce, animalul nu mai face nevraxita caracteristică şi supravieţuieşte.

Inoculare corneeană. După inoculare corneeană de virus herpetic neencefalitogen (tulpină „slabă") la iepure, germenii ajung, pe calea nervului trigemen, în creier, unde pot fi găsiţi a 5-a zi şi unde prezenţa lor nu determină nici un proces encefalitic.

Dacă unui animal inoculat cu un asemenea virus pe cornee i se inoculează a 4-a zi, a 5-a zi sau mai tîrziu, în creier, o tulpină „forte", encefalitogenă, de virus herpetic, acest din urmă virus nu are în creier nici o manifestare aparentă, encefalita herpetică nu se mai produce, animalul rămîne sănătos. „Imunitatea creată extrem de rapid de prima inoculare de virus herpetic pe cornee este solidă şi durabilă" (Magrassi).

Inoculînd pe cornee o tulpină „forte" encefalitogenă, Magrassi constată că inocularea ulterioară intracerebrală nu numai că nu produce ea însăşi nevraxită, dar împiedică virusul inoculat pe cornee să dea encefalita mortală pe care o produce martorului nereinoculat în creier.

Doerr şi Seidenberg (30) arată că această rezistenţă faţă de inocularea secundară intracerebrală se produce mai repede dacă tulpina de virus cu care se face inocularea primară corneeană este encefalitogenă. Aceasta ar fi datorită faptului că tulpina cea mai virulentă migrează de la cornee, mai repede, în creier. Migraţia are loc de-a lungul nervilor (89), în care virusul poate fi găsit de la 48 de ore pînă la 4 zile de la inoculare; ulterior intervine „autosterilizarea" şi atît nervii cît şi, mai tîrziu, creierul apar lipsiţi de germeni virotici.

Dacă prin inoculări la animale noi se caută virusul în creier, scurt timp după inocularea secundară intracerebrală, el poate fi găsit timp de cîteva zile.

Magrassi denumeşte această stare de rezistenţă „imunitate faţă de superinfecţie". Ea are loc numai dacă virusul din inocularea primară (corneeană) se află în creier în momentul inoculării secundare (intracerebrale); curînd însă se produce „autosterilizarea" şi creierul apare lipsit de germeni.

Nu este vorba însă de o reală autosterilizare cu distrugerea virusului, ci mai degrabă de o neutralizare, deoarece creierul aparent autosterilizat, injectat la animale noi, imunizează.

Nu este posibil să se prevină instalarea encefalitei mortale după inocularea corneeană cu o tulpină de virus „forte", dacă a doua inoculare

Scanned with OKEN Scanner

se face pe cealaltă cornee în loc să se facă în creier ; neutralizarea reciprocă a celor două tulpini de virus inoculate pe căi diferite nu are loc în acest caz, cu toate că ambele se întîlnesc în creier.

Inoculare cutanată. După inocularea virusului herpetic pe cale intradermică sau pe pielea scarificată a iepurelui, simptomele de mieloencefalită apar a 8-a sau a 10-a zi. E posibil să se prevină instalarea acestor simptome printr-o a doua inoculare, aceasta însă în creier, de virus herpetic proaspăt sau chiar formolat, însă numai dacă această inoculare are loc în a 7-a sau a 8-a zi. Acesta este al doilea exemplu cînd două infecţii cu acelaşi virus se anihilează reciproc, virusul fiind mai curînd neutralizat decît distrus.

Neutralizarea incontestabilă a virusului, care se produce în cursul acestor experienţe, nu este datorită unor substanţe neutralizante din creierul imunizat. Există, fără îndoială, o oarecare creştere a anticorpilor serici în organismul acestor animale, însă cu totul insuficientă pentru a explica fenomenul. Se ştie că virusul formolat, injectat intradermic, produce în organism un titru de anticorpi mai ridicat decît virusul viu, însă animalele imunizate în acest fel posedă un grad mult mai redus de imunitate cerebrală decît cele ce primesc virus viu. Trebuie remarcat însă că inoculările reuşesc să se anihileze reciproc *numai* dacă cea de-a doua este făcută pe cale intracerebrală.

Imunitatea faţă de superinfecţie este deci condiţionată nu numai de calitatea virusului din inocularea secundară, ci şi de calea utilizată.

Reinocularea pe cale corneeană nu opreşte într-o stare de latenţă mersul infecţiei primare, aşa cum s-a observat la reinfecţia cerebrală.

Doerr şi Hallauer (27), inoculînd intravenos o tulpină neencefalitogenă cu tropism medular, obţin la iepure o stare de rezistenţă localizată la segmentul medular dorsal şi la cel lombar.

Reinoculînd periferic aceste animale cu o tulpină virulentă de virus herpetic nu constată apariţia fenomenelor de encefalită dacă virusul în propagarea lui centripetă trecea prin aceste segmente medulare.

Ca şi în experienţele lui Magrassi virusul neencefalitogen a fost pus în evidenţă în măduvă în a 6-a zi de la inoculare.

Autorii au arătat că inocularea intravenoasă a tulpinii virulente de virus herpetic nu determină fenomene de nevraxită decît dacă ea este practicată la 6 zile de la inocularea primară, deci în momentul cînd primul virus se găseşte în măduvă.

Aceste date experimentale, cît şi faptul că aceste animale nu rezistă la reinocularea intracerebrală (imunitatea faţă de superinfecţie fiind deci nulă) îl determină pe Doerr să denumească acest fenomen „imunitate de cale" (*Shinnen immunisierung*).

Danielescu (25), studiind la iepuri inoculaţi intravenos cu o tulpină de virus herpetic neencefalitogenă starea de rezistenţă faţă de aceeaşi tulpină de virus inoculată pe cale intracerebrală, obţine rezultate (prelungi-

Scanned with OKEN Scanner

rea perioadei de incubaţie) numai în cazul cînd se păstrează un anumit interval (48 de ore) între cele două inoculări şi un anumit raport între cantităţile virusului inoculat intravenos şi intracerebral (dil. 1/10 000).

Autoarea demonstrează însă cu această ocazie că inocularea pe cale cutanată a tulpinii neencefalitogene de virus herpetic conferă o foarte slabă rezistenţă precoce faţă de reinfecţia intracerebrală.

Explicarea fenomenului „imunităţii faţă de superinfecţie" depinde desigur de reacţii ale creierului (Van Rooyen), reacţii de tip necunoscut pînă azi. Fenomenul ar intra în categoria „fenomenelor de interferenţă".

B. IMUNITATEA ANTIHERPETICĂ LA OM

Omul, care din vremuri străvechi este expus la virusul herpetic, are faţă de acesta o sensibilitate mult mai redusă decît iepurele.

Cu excepţia unor cazuri rare, omul reacţionează totdeauna la infecţia exogenă experimentală, însă aceasta nu provoacă niciodată o infecţie generalizată (161) (163). Omul nu posedă deci o veritabilă imunitate antiherpetică, o *imunitate generală*, naturală sau dobîndită. Aria pielii care a reacţionat la infecţie rămîne, după vindecare, insensibilă pentru o anumită perioadă la inocularea aceluiaşi virus ; se poate vorbi deci de o *imunitate locală*. Cînd acest fenomen se extinde la regiunile învecinate, se poate vorbi de o *imunitate regională* (59) (60).

Este foarte plauzibil că lipsa unei sensibilităţi pronunţate a omului faţă de virusul herpetic este factorul care împiedică după infecţie instalarea stării refractare generale, solide, căci acelaşi virus, puţin imunizant pentru om, este puternic imunizant pentru animalul receptiv şi cu cît infecţia la animal este mai severă, cu atît şi imunitatea consecutivă este mai solidă şi mai durabilă.

În orice caz, este probabil că indivizii care în mod obişnuit nu prezintă erupţii spontane de herpes *sînt pînă la un anumit punct imunizaţi* faţă de proprii lor germeni ; ei posedă deci o anumită imunitate. Totuşi, este suficient ca învelişul lor cutaneo-mucos să prezinte o „pată" sau ca „tonusul imunotrofic" să fi cedat în urma unei influenţe oarecare (73), pentru ca virusul, transportat fie prin curentul circulator, fie prin oricare altă cale, să se fixeze şi să determine o erupţie herpetică. Această sensibilitate parţială, această învingere a rezistenţei locale pare să se producă sub influenţa sistemului nervos.

Cauzele adjuvante care prilejuiesc apariţia manifestărilor herpetice (boli infecţioase, intoxicaţii, traumatisme, şocuri umorale etc.) determină probabil o atenuare a rezistenţei naturale sau dobîndite, atenuare care nu mai permite indivizilor să reziste faţă de virusul pe care îl poartă deja, sau îi lasă lipsiţi de apărare faţă de contagiul la care sînt expuşi în permanenţă.

Scanned with OKEN Scanner

Absenţa imunizării locale la persoanele afectate de herpes recidivant, precum şi sensibilitatea electivă a unei zone limitate, totdeauna aceeaşi faţă de virus, s-ar explica prin modificările provocate de germeni cu ocazia primei manifestări pe teritoriul afectat în sistemul nervos de care depinde regiunea respectivă.

Virusul ar vegeta între două recidive, în stare de germen „biofit", într-un loc determinat al sistemului nervos, în speţă în ganglionul spinal corespunzînd regiunii cutanate interesate (108) (43) (33) (113) şi nu în regiunea de piele interesată, unde nu a putut fi găsit (107) (111) (112) (33), iar această piele, transplantată în altă regiune a corpului, nu a mai fost sediul erupţiilor (142).

Cauze multiple şi variabile pot dirija recidiva, cauze care acţionează fie asupra sistemului nervos, fie chiar asupra tegumentelor.

Pentru a evita recidivele, diferiţi autori au înlăturat porţiunea de tegument afectată periodic de erupţie şi au înlocuit-o cu o grefă de piele sănătoasă (112) (33); vindecarea a fost totală şi definitivă.

IMUNITATE UMORALĂ

1. ANTICORPI SERONEUTRALIZANŢI

Imunitatea tisulară nu este singurul factor care face ca organismul să devină refractar la infecţia herpetică experimentală; ea este completată de imunitatea umorală.

Levaditi, Harvier şi Nicolau (74) au decelat prezenţa anticorpilor neutralizanţi în serul de oaie inoculată de mai multe ori subcutanat cu virus herpetic proaspăt. Aceiaşi anticorpi au fost găsiţi în serul iepurelui imunizat de către Mariani (88), Flexner şi Amoss (34), Greenbaum şi Harkins (50), Zinsser şi Tang (160), Bedson şi Crawford (10), Schultz şi Hoyt (137), Freund (40), Gay şi Holden (45), Smith (140) şi în creierul şi suprarenalele aceloraşi animale de către Levaditi şi Nicolau (77), Teissier, Gastinel şi Reilly (152).

Studiind capacitatea neutralizantă a serurilor provenite de la iepurii imunizaţi, Doerr şi Vöchting (31), Blanc, Tsiminakis şi Caminopetros (13), Morelli (91), Luger şi Lauda (84) şi Perdrau (122) obţin însă rezultate negative.

Aceste rezultate contradictorii obţinute de primul şi cel de-al doilea grup de cercetători se datoresc tehnicilor diferite întrebuinţate de ei. Yoshino şi Taniguchi (164) constată că serul de iepure, obţinut la 1—2 săptămîni de la inocularea unei doze de virus herpetic *simplex*, conţine anticorpi neutralizanţi care nu sînt activi decît în prezenţa complementului

Scanned with OKEN Scanner

(ser proaspăt de cobai). Cercetînd cinetica neutralizării, autorii evidenţiază faptul că ea este în funcţie de momentul recoltării serului de iepure şi de cantitatea complementului introdus în reacţie. Anticorpii precoce (activi în prezenţa complementului) sînt, ca şi anticorpii tardivi, o gamaglobulină cu o constantă de sedimentare 7S, fapt ce demonstrează că este vorba de stadii evolutive ale aceluiaşi anticorp.

Calitatea complementului de a potenţa anticorpii neutralizanţi este direct proporţională cu unităţile sale hemolitice (147).

Neutralizarea virusului de către anticorpii precoce, în prezenţa complementului, este mai rapidă la 37° C decît la +4° C; se produce mai întîi o combinare ireversibilă între virus şi anticorpi, după care urmează inactivarea virusului (165). Spre deosebire de Teissier, Gastinel şi Reilly (153), Bedson şi Crawford (10) evidenţiază în cercetările lor prezenţa anticorpilor neutralizanţi din serul cobailor imunizaţi experimental. Aceiaşi anticorpi au fost însă puşi în evidenţă de Olitsky şi Long (115) în serul unor cobai normali; serul acestora neutralizează numai tulpinile „slabe" de virus herpetic.

Sosa-Martinez şi Lennette (141) cercetează momentul apariţiei şi durata în timp a anticorpilor neutralizanţi în serul cobailor imunizaţi antiherpetic şi constată apariţia lor la 2 săptămîni de la administrarea primei doze de virus, după care titrul lor creşte treptat menţinîndu-se foarte ridicat în următoarele 3 săptămîni.

La şoarecii imunizaţi, Gildemeister şi Ahlfeld (47) pun de asemenea în evidenţă prezenţa anticorpilor neutralizanţi în serul lor.

În cercetările lor, Watkins şi Lepow (156) constată că starea de rezistenţă conferită şoarecelui prin inocularea virusului herpetic intranazal sau intracerebral nu este în legătură cu anticorpii seroneutralizanţi.

Începînd din a 5-a — a 6-a zi, animalele devin imune la inocularea de probă intracerebrală; imunitatea se menţine timp de 3 săptămîni, pentru ca în următoarele 2 săptămîni să scadă. Cercetările serologice întreprinse la aceste animale au evidenţiat anticorpi neutralizanţi însă în titruri foarte mici.

La om, aceiaşi anticorpi au fost puşi în evidenţă de Zinsser şi Tang (161) la 86,7% din persoanele vindecate de encefalită letargică, la 64,7% din indivizii normali cercetaţi şi la 43,4% din copiii internaţi în spital cu diverse afecţiuni. Procentajul serurilor pozitive a fost de 25% la cei în vîrstă de 0 — 7 ani. Andrewes şi Carmichael (5) găsesc însă anticorpi neutralizanţi în 72% din cazuri la parkinsonieni şi în 75% din cazuri la indivizi neselecţionaţi; 7 indivizi purtători de herpes labial au prezentat 100% anticorpi neutralizanţi antiherpetici.

În cercetările lor, Gay şi Holden (46) constată aproape acelaşi procent de reacţii pozitive ca şi Zinsser şi Tang; în serurile indivizilor normali, fără leziuni herpetice, însă cu reacţia Bordet-Wassermann pozitivă, anticorpii antiherpetici au fost prezenţi în 87% faţă de 88% cît au fost găsiţi la cei cu seroreacţia Bordet-Wassermann negativă.

Scanned with OKEN Scanner

Studiul anticorpilor neutralizanţi făcut pe un număr mic de cazuri de herpes acut a arătat că reacţia este pozitivă în 4 cazuri din 9 cercetate; numai în 5 din 7 seruri prelevate de la cazuri de herpes recidivant s-au evidenţiat anticorpii seroneutralizanţi. În 2 din cele 13 cazuri de encefalită acută studiate s-au depistat anticorpii neutralizanţi, în timp ce în encefalitele cronice au fost evidenţiaţi în 23 din 42 cercetate.

Cercetările serologice întreprinse de Weyer (158), Burnet şi colab. (18), Burnet şi Williams (21), Gallardo (42), Buddingh (16), Nagler (93), Roze şi Mollony (130) etc. au demonstrat că anticorpii antiherpetici sînt mult mai frecvent întîlniţi la adulţi decît la copii. Prezenţa lor la această vîrstă este în directă legătură cu infecţia herpetică primară din copilărie.

Weyer (158) evidenţiază, prin testul de neutralizare pe şoarece, prezenţa anticorpilor la 14% din copiii de 0 — 5 ani şi la 38% din cei de 5 — 10 ani; autorul constată că incidenţa anticorpilor creşte cu vîrsta, astfel încît între 15 şi 25 de ani ei sînt prezenţi într-un procentaj foarte ridicat (90); după această vîrstă scad la 65% între 40 şi 45 de ani şi la 54% peste această vîrstă. Cei 27 de copii lipsiţi de anticorpi antiherpetici s-au arătat ulterior, în cursul unei epidemii de poliomielită, sensibili faţă de această din urmă boală.

Pentru Weyer, prezenţa anticorpilor antiherpetici în organism ar opune o anumită rezistenţă faţă de virusul bolii Heine-Medin. Ipoteza a fost sprijinită de faptul constatat de Weyer că maimuţele imunizate contra poliomielitei (boala lui Heine-Medin) conţin — în afară de anticorpii omologi — anticorpi herpetici, panimunitari (*panimmune bodies*); copiii purtători de leziuni eruptive herpetice în cursul epidemiilor de poliomielită ar fi mult mai puţin expuşi de a contracta această boală decît copiii normali.

În cercetările sale, Przesmychi şi colab. (128) constată însă că numai unii din copii de 0 — 1 an au anticorpi neutralizanţi, în timp ce numărul serurilor pozitive creşte cu vîrsta în aşa fel încît incidenţa cea mai mare de anticorpi se găseşte între 11 şi 15 ani; după această vîrstă, incidenţa anticorpilor scade iarăşi.

Buddingh şi colab. (17), folosind ca şi Przesmychi şi colab. testul de neutralizare pe membrana corioalantoidă în depistarea anticorpilor la copii, demonstrează că între 0 şi 6 luni ei sînt prezenţi atît la albi cît şi la negri, însă în procente diferite (79% faţă de 93%).

Procentajele asemănătoare evidenţiate şi la mamele copiilor investigaţi i-a determinat pe autori să considere că anticorpii la această vîrstă sînt de origine maternă.

Între 7 luni şi 2 ani anticorpii sînt prezenţi la 43% din albi şi la 71% din negri; la copiii între 3 şi 14 ani procentajele sînt identice la albi şi negri (85% şi respectiv 86%), pentru ca peste 15 ani numărul serurilor pozitive să ajungă la 90% la albi şi 96% la negri.

Rodrigues şi Carvalho (129), studiind indivizi între 6 luni şi 84 de ani evidenţiază prezenţa anticorpilor seroneutralizanţi la 70,7% dintre ei.

Scanned with OKEN Scanner

Pe grupe de vîrstă, autorii constată că anticorpii sînt absenţi între 6 şi 11 luni, reacţiile serologice sînt apoi pozitive în următoarele procentaje: 12,5% între 12 şi 23 luni, 75% la 2 ani, 64,3% între 3 şi 4 ani, 83% între 5 şi 10 ani şi 11 şi 20 de ani, 93,3% între 21 şi 40 de ani şi în 83,3% peste 40 de ani.

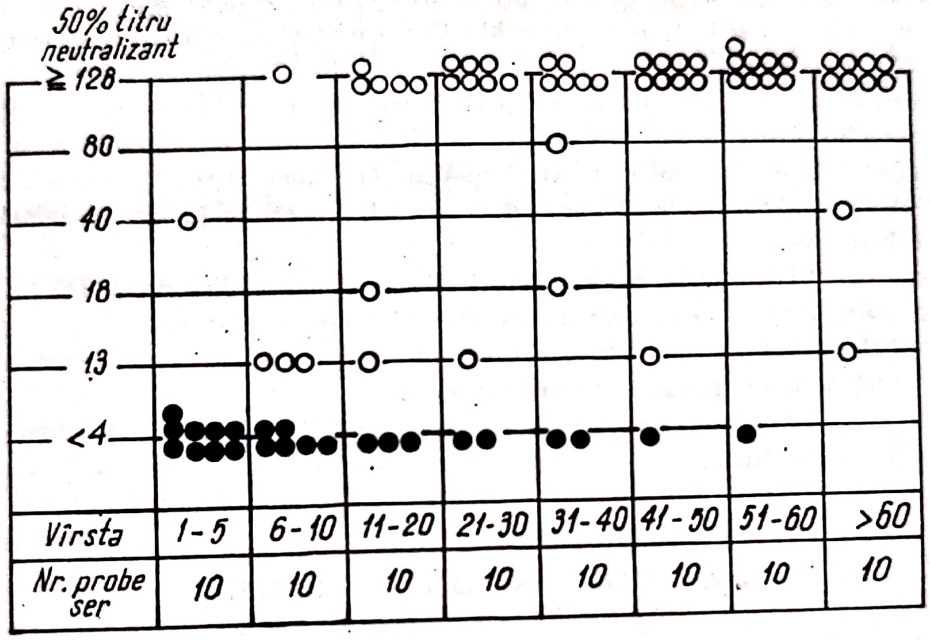


Fig. 115. — Distribuţia pe vîrste a anticorpilor neutralizanţi faţă de virusul herpetic *simplex*, Tateno şi colab., 1958.

Tateno şi colab. (148) constată că anticorpii neutralizanţi scad cu vîrsta (fig. 115).

Diverşi autori au studiat însă prezenţa anticorpilor neutralizanţi în diverse forme clinice de infecţie herpetică. Astfel Burnet şi Lush (19) şi Burnet şi Williams (21) constată la copii cu stomatită de la care s-a izolat virusul o creştere în titru a anticorpilor seroneutralizanţi antiherpetici şi demonstrează prin aceasta în mod cert că virusul herpetic este agentul etiologic al stomatitei.

Scott, Steigman şi Convey (139), studiind 35 de copii între 1 şi 12 ani cu gingivo-stomatită, pun în evidenţă o creştere a titrului anticorpilor seroneutralizanţi în 21 din cazuri, procentajul cel mai ridicat (70%) fiind sub vîrsta de 6 ani.

Studiind 23 de cazuri cu gingivo-stomatite la copii între 1 şi 15 ani, Black (11) arată că maximul de îmbolnăviri apare între $1^1/_2$ şi 2 ani, iar anticorpii neutralizanţi sînt depistaţi la aproape toţi aceşti copii.

Anderson şi Hamilton (2), urmărind 51 de copii sub 3 ani la care nu s-au observat leziuni de stomatită herpetică, demonstrează prezenţa anticorpilor neutralizanţi la 29 dintre ei. Pe o pe-

rioadă de 11 luni cît au fost urmăriţi, autorii constată la 7 o creştere în titru a anticorpilor, ceea ce demonstrează că ei au făcut o formă de herpes, inaparentă clinic ; la 10 dintre ei titrurile au scăzut treptat, pentru ca apoi ei să dispară complet, fapt care i-a determinat pe autori să eticheteze aceşti anticorpi ca fiind de origine maternă.

După Buddingh şi colab. (17) anticorpii seroneutralizanţi apar în sîngele bolnavilor cu stomatită herpetică între a 4-a şi a 17-a zi, titrurile maxime fiind evidente în a 3-a şi a 4-a săptămînă de boală.

Studiind etiologia herpetică a erupţiei variceliforme Kaposi apărută la un copil de 6 luni, Jaquette, Convey şi Pillsbury (66) evidenţiează o creştere în titru a anticorpilor neutralizanţi.

Aceeaşi creştere în titru o constată şi Ruchman şi colab. (131) (132) la adulţii cu erupţie variceliformă a lui Kaposi.

Prin testul de seroneutralizare, Afzelius-Alm (1) demonstrează că 7 din cele 145 de cazuri de encefalită observate sînt determinate de virusul herpetic, boala fiind o manifestare a primoinfecţiei herpetice.

Creşterea în titru a anticorpilor seroneutralizanţi la un copil cu encefalită l-a determinat pe Scott şi colab. (138) să considere cazul ca fiind o infecţie herpetică.

Gay şi Holden (46) arată că în cazurile de encefalită acută 15 % au anticorpi seroneutralizanţi faţă de 54 % cît se găsesc în cazurile cronice.

Un procent destul de ridicat de reacţii pozitive (70 %) a fost observat de autori la bolnavii cu herpes recidivant.

2. ANTICORPI FIXATORI DE COMPLEMENT

Au fost puşi în evidenţă atît la animalele imunizate antiherpetic, cît şi la oameni aparent sănătoşi sau cu infecţie herpetică manifestă.

S-a demonstrat că anticorpii fixatori de complement sînt prezenţi în serul maimuţelor (154), iepurilor (50) (69) (70) (145) şi cobailor (39) după imunizarea cu virus herpetic.

Myers şi Chapman (92) evidenţiază şi ei prezenţa anticorpilor fixatori de complement la animalele imunizate, însă rezultatele nu au fost concludente datorită diferenţelor între aceste animale şi cele martore, neimunizate.

Bedson şi Crawford (10) observă însă că serul hiperimun de cobai, deşi conţine anticorpi neutralizanţi, nu dă reacţii pozitive în fixarea complementului ; ulterior Gay şi Holden (45) şi Tang şi Castaneda (146) obţin cu serurile imune de iepure aceleaşi rezultate negative.

Folosind în reacţie antigene preparate prin metode mai perfecţionate, Bedson şi Bland (9) evidenţiază prezenţa anticorpilor în serul imun de iepure şi stabilesc totodată că rezultatele în reacţia de fixare a complementului depind de antigenul folosit.

Scanned with OKEN Scanner

Brain (14), cercetînd serologic seruri umane, stabileşte că anticorpii fixatori de complement sînt prezenţi într-o proporţie de 45% la persoane neselecţionate. Hayward (56) obţine însă în 75 din cele 95 de seruri umane cercetate rezultate pozitive şi conchide că la indivizii cu antecedente herpetice poate fi detectată prezenţa anticorpilor fixatori de complement.

De altfel, Hallonen (54), studiind 126 de indivizi dintre care 21 cu infecţie herpetică şi 105 fără antecedente herpetice, constată la primul lot prezenţa anticorpilor fixatori de complement în proporţie de 100%, în timp ce la cel de-al doilea lot numai în proporţie de 60%.

S-a demonstrat că titrurile anticorpilor fixatori de complement cresc în cursul bolii herpetice (32) (138) (41) (54).

Gajdusek şi colab. (41) arată că prezenţa anticorpilor fixatori de complement nu poate fi pusă în evidenţă la bolnavii la care titrurile anticorpilor seroneutralizanţi sînt mici. Efectuînd în paralel reacţiile de seroneutralizare şi fixare a complementului, Dudgeon (32) constată că 30 din 40 de seruri cercetate reacţionează pozitiv în ambele reacţii.

Ca şi anticorpii seroneutralizanţi, procentajele anticorpilor fixatori de complement variază cu vîrsta indivizilor cercetaţi. S-a arătat astfel de către Holzel şi col. (58) că la 0—1 lună incidenţa lor este de 77%, pentru ca apoi, pînă la vîrsta de 1 an, ei să descrească treptat. Urmează apoi o uşoară creştere a lor în aşa fel încît între 1 şi 2 ani incidenţa să fie de 30%, între 5 şi 15 ani de 63% şi peste 15 ani de 86%.

Hallonen (54) dă următoarele procentaje ale prezenţei anticorpilor fixatori de complement: 56% la 0—3 luni, 2% la 3—12 luni, 25% la 1—3 ani, 38% la 3—7 ani şi 46% la 7—15 ani. Între 20 şi 77 de ani anticorpii au variaţii între 40 şi 45% (la 20 de ani proporţia fiind de 45%, la 24 de ani de 41% şi la 77 de ani de 40%).

Procentajele mult mai scăzute faţă de alţi autori (1) sugerează lui Hallonen faptul că aceste variaţii depind de la o ţară la alta. Acest fapt este şi mai concludent la persoanele peste 70 de ani. Astfel, în Italia ei au fost puşi în evidenţă în proporţie de 100% (26), în Danemarca de 86% (58), iar în Franţa de 21,5% (6).

S-ar părea că această diferenţă ţine pe de o parte de antigenele folosite în reacţie, iar pe de alta de factorii epidemiologici, social-economici şi igienici.

PARAIMUNITATE

În urma unor viroze imunizante, pe lîngă starea refractară specifică, omologă, numită *imunitate*, mai poate apărea în organism şi o rezistenţă nespecifică, eterologă, împotriva unui virus diferit de cel imunizant; această

rezistenţă „secundară", nespecifică, a fost numită *paraimunitate* (Nicolau (95) (96)).

Starea de paraimunitate este mai slabă şi nu ajunge niciodată să egaleze în intensitate starea refractară specifică cîştigată, imunitatea. Anticorpii eterologi, secundari, paraimunitari, sînt mai puţin activi decît cei specifici, primari, omologi, ce caracterizează imunitatea; oricît s-ar forţa vaccinarea specifică — imunizarea — nu se poate obţine decît intensificarea imunităţii omologe antigenului imunizant, dar nu şi creşterea rezistenţei nespecifice ce defineşte paraimunitatea.

1. RELAŢII DE PARAIMUNITATE ÎNTRE HERPES ŞI VACCINĂ

Starea de paraimunitate se manifestă printr-o rezistenţă căpătată faţă de anumiţi inframicrobi, iar nu faţă de orice viroză. S-a arătat astfel, de către Gildemeister şi Herzberg (48) (49) că serul iepurilor imunizaţi împotriva infecţiei herpetice experimentale dă o stare refractară parţială contra virusului vaccinal, precum şi prezenţa unor anticorpi antivaccinali în sînge. Zurukzoglu (162) arată în plus că serul animalelor imunizate contra vaccinei posedă de asemenea proprietăţi neutralizante faţă de virusul herpetic.

Acest autor remarcă un fapt extrem de important, şi anume că serurile animalelor imunizate au capacitate neutralizantă mai redusă faţă de virusul eterolog decît faţă de cel omolog.

Toate aceste constatări le confirmă apoi Freund (40), care precizează în acelaşi timp că ar fi vorba de germeni inframicrobieni „înrudiţi" şi deci de o „imunitate încrucişată" între aceste virusuri. Ba mai mult, autorul obţine leziuni plantare vaccinale de o intensitate mult diminuată faţă de martori prin inocularea acestui virus la cobaii ce primiseră anterior cîteva injecţii cu ser antiherpetic. Autorul afirmă că atenuarea intensităţii manifestărilor vaccinale consecutiv administrării prealabile a serului antiherpetic aduce o confirmare a rezultatelor obţinute de Gildemeister şi Herzberg.

Bedson şi Bland (8) pe de o parte, Pette (124) pe de alta, lucrînd în condiţii experimentale diferite de cele ale autorilor de mai sus, ajung la concluzia absenţei imunităţii încrucişate între herpes şi vaccină.

2. RELAŢII DE PARAIMUNITATE ÎNTRE HERPES ŞI POLIOMIELITĂ

S-au găsit anticorpi herpetici la om; faptul nu este surprinzător, fiindcă se ştie că în natură omul este adesea în conflict cu virusul herpetic.

Zinsser şi Tang (161) găsesc anticorpi herpetici la 25% din copii între 0 şi 7 ani, la 43,4% din copii în general şi la 64,7% din indivizii normali adulţi.

Scanned with OKEN Scanner

Andrewes şi Carmichael (5) obţin în reacţia de neutralizare rezultate pozitive faţă de virusul herpetic în 75% din serurile provenite de la oameni adulţi, iar Brain (14) în 100% din adulţii cercetaţi.

Gay şi Holden (46) au rezultate asemănătoare celor de mai sus.

În raport cu vîrsta, Weyer (158) constată prezenţa de anticorpi neutralizanţi antiherpetici în proporţiile următoare: la copii între 0 şi 5 ani, 14%; între 5 şi 10 ani, 38%; între 10 şi 15 ani, 40%.

Burnet şi Dora Lush (19), totalizînd rezultatele obţinute de diverşi autori la omul normal, găsesc că din 545 de seruri de adulţi, 405 au dat rezultate pozitive (74%).

S-au găsit însă anticorpi herpetici în natură la animale normale, la maimuţă (133) (157), cobai (115). Or, este exclus ca aceşti anticorpi să fi fost elaboraţi în organismul animal sub influenţa acţiunii virusului omolog, care nu afectează în natură decît omul. Deci alte infecţii la care au fost supuse în mod întîmplător aceste animale în natură au determinat apariţia în sînge a anticorpilor herpetici.

S-a dovedit de către Weyer (158) că maimuţele imunizate contra poliomielitei au în serul lor nu numai anticorpi antipoliomielitici, ci şi anticorpi antiherpetici.

S-a sugerat ideea că absenţa anticorpilor antiherpetici la copii ar fi o cauză a sensibilităţii acestora faţă de contagiul în natură cu virusul poliomielitei. Într-adevăr, Weyer caută anticorpi neutralizanţi antiherpetici la copii; adună 27 de cazuri care s-au dovedit sensibile la poliomielită; serurile acestor 27 de cazuri nu conţineau anticorpi herpetici. Autorul, interpretînd prezenţa anticorpilor herpetici la maimuţele imunizate contra poliomielitei, creează termenul de „panimmune bodies", de anticorpi „panimunitari", anticorpi a căror apariţie ar fi condiţionată de antigenul eterolog poliomielitic.

Ar rezulta din ansamblul constatărilor lui Weyer că *prezenţa anticorpilor antiherpetici în serul uman ar constitui un anumit baraj împotriva contaminării cu virus poliomielitic.*

Receptivitatea accentuată a unor copii faţă de poliomielită, receptivitate condiţionată de absenţa anticorpilor herpetici, nu este însă admisă de Burnet şi Lush (19). Prin experienţe de neutralizare a virusului herpetic pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, pe care inframicrobul însămînţat se dezvoltă în mod obişnuit, aceşti autori arată că din 14 bolnavi de poliomielită 8 aveau la începutul bolii anticorpi herpetici, al căror titru nu a crescut în convalescenţă; ceilalţi 6, lipsiţi de anticorpi herpetici la începutul poliomielitei, au rămas lipsiţi de aceşti anticorpi şi 2—3 luni după boală. De asemenea, două probe de amestecuri de stoc-ser antipoliomielitic de maimuţă s-ar fi dovedit — în experienţele lui Burnet şi Lush — lipsite de anticorpi herpetici.

Concluziile autorilor australieni sus-citaţi pierd valabilitatea lor în faţa rezultatelor obţinute de alţi cercetători.

Stroe şi Ionescu (144) au inoculat virus herpetic pe tegument la 19 copii bolnavi de poliomielită, obţinînd 14 rezultate pozitive şi 5 negative. Autorii au crezut că pot afirma absenţa unei „imunităţi încrucişate" între poliomielită şi herpes. În realitate, această concluzie trasă pe un număr redus de cazuri şi privind poliomielita în faza ei acută trebuie interpretată şi modificată în lumina ultimelor investigaţii.

Nicolau şi colab. (114), reluînd cercetările, efectuează în diversele stadii ale evoluţiei poliomielitei 36 de heteroinoculări (inoculări cu virus din veziculele herpetice) şi 19 inoculări cu emulsie de creier de iepure ce conţinea virus herpetic, după o uşoară scarificare în regiunea deltoidiană.

Pe zile, de la debutul bolii lui Heine-Medin, autorii au făcut :

— 10 inoculări între 10 şi 28 de zile,
— 20 de inoculări între 28 şi 68 de zile,
— 25 de inoculări între 68 de zile şi 7 ani.

1) Din cele 10 inoculări cu virus herpetic executate în prima lună de boală poliomielitică, 8 rezultate au fost pozitive şi 2 negative ; numărul rezultatelor pozitive este deci de 4 ori mai mare decît al celor negative ; această cifră se apropie de proporţia cazurilor pozitive faţă de cele negative din literatură (35) (36) (37). Astfel, Teissier, Gastinel şi Reilly (149) (151) obţin, din 10 heteroinoculări, 7 rezultate pozitive şi 3 negative, pe cînd Nicolau şi Poincloux (112), din 18 inoculări cu material corneean, au 16 rezultate pozitive şi două negtive, iar cu material cerebral, 7 pozitive şi 11 negative.

2) Din lotul al doilea de inoculări executate între a 28-a şi a 68-a zi de boală, la poliomielitici, 5 rezultate au fost pozitive şi 15 negative ; raportul este deci aproape inversat, numărul cazurilor pozitive fiind de 3 ori mai mic decît cele negative. Este ca şi cum poliomieliticii, în cursul evoluţiei, ar căpăta o rezistenţă faţă de infecţia herpetică.

3) La lotul al 3-lea de 25 de poliomielitici, vindecaţi şi deci imunizaţi contra bolii lui Heine-Medin, rezultatul inoculărilor herpetice a fost negativ în 24 din 25 de cazuri. Unicul caz pozitiv reprezenta un copil care avusese cu 7 ani înainte o poliomielită ce-i lăsase sechele ; erupţia herpetică experimentală, de intensitate medie, a durat în acest caz 4 zile.

În raport cu felul *materialului inoculat*, autorii au avut : *a*) din 36 de heteroinoculări cu virus herpetic, 11 cazuri pozitive (la poliomielitici între a 10-a şi a 61-a zi de la începutul bolii) şi 24 negative (la poliomielitici între a 68-a şi a 210-a zi de la începutul bolii), plus un caz pozitiv care avusese poliomielită cu 7 ani mai înainte ;

b) din 19 inoculări cu material virulent herpetic provenit din creierul iepurilor de pasaj, 2 cazuri pozitive (la 12 şi 15 zile de la debutul poliomielitei) şi 17 cazuri negative (de la 25 de zile pînă la 4 ani şi 9 luni de la începutul poliomielitei).

Se cunoaşte, în principiu, că procentul inoculărilor pozitive cu virus herpetic la om este mai redus cînd se foloseşte virus cerebral. Astfel, într-o

Scanned with OKEN Scanner

experienţă pe 26 de indivizi inoculaţi cu virus cerebral de iepure, Nicolau şi Poincloux au avut numai 16 rezultate pozitive.

Virusul herpetic provenind din creierul iepurelui de pasaj nu este tot atît de apt de a produce erupţii tegumentare la omul inoculat pe cale intracutanată ca cel recoltat din veziculele herpetice. Inocularea de virus cerebral herpetic, la indivizi cu rezistenţa de bază antiherpetică mărită de o paraimunizare determinată de apariţia imunităţii antipoliomielitice, face ca procentul reacţiilor pozitive să fie încă mai redus.

De altfel, şi apariţia mai precoce a rezistenţei paraimunitare antiherpetice la poliomielitici, în a 25-a zi în cazul inoculărilor de material cerebral faţă de a 64-a zi în cazul heteroinoculărilor cu lichid vezicular, tradusă prin rezultatul negativ al inoculării herpetice experimentale, se explică în acelaşi mod.

De remarcat că singurele cazuri de inoculare negativă obţinute în prima lună de poliomielită ţin de utilizarea materialului cerebral (două cazuri). Lăsînd la o parte cazurile vechi cu poliomielită de peste un an (un număr de 13), din cele 6 cazuri mai noi, inoculate cu material cerebral (poliomielita datînd de 12—35 de zile), 2 au fost pozitive, iar 4 negative; raportul fiind de 1/2, este destul de apropiat de rezultatele găsite în literatură (Nicolau şi Poincloux).

Aceste date tind să arate totuşi că inoculabilitatea materialului cerebral se apropie de aceea a lichidului vezicular; ceea ce face să varieze întrucîtva rezultatele nu este atît virulenţa deosebită a celor două materiale de inoculare, cît răspunsul organismului, căpătarea unei rezistenţe antiherpetice mai mari în cursul evoluţiei poliomielitei.

Reiese în mod clar că în poliomielită, alături de starea refractară specifică propriu-zisă faţă de virusul poliomielitei (imunitate), se instalează şi o rezistenţă nespecifică heterologă (paraimunitate) faţă de virusul herpetic.

Reciproca este însă ea adevărată?

Cu alte cuvinte un copil, inoculat cu virus herpetic pe tegument, capătă o anumită stare refractară, paraimunitară, contra poliomielitei?

Se ştie că poliomielita afectează rareori mai mulţi membri ai aceleiaşi familii.

De ce?

Agresivitatea virusului fiind redusă faţă de terenul uman normal, se presupune că din colectivitatea familială, un membru, maximum doi, au *rezistenţa de bază* a terenului scăzută. Se ştie că în poliomielită, pentru un bolnav cu simptome manifeste, există zeci de indivizi care fac boala inaparent, asimptomatic, singura consecinţă fiind imunitatea consecutivă. În aceste cazuri, rezistenţa de bază a indivizilor se opune apariţiei bolii.

În paraimunitate, *rezistenţa de bază* creşte. Este oare posibil ca infecţia herpetică să producă acest rezultat faţă de contaminarea cu virus poliomielitic?

Specificitatea anticorpilor seroneutralizanţi faţă de virusul poliomielitic II (Lansing). Studiul anticorpilor neutralizanţi faţă de virusul poliomielitic II (Lansing) a preocupat un mare număr de cercetări care, în diferite puncte ale globului au căutat să lămurească incidenţa şi semnificaţia prezenţei lor în serul uman.

Dintre studiile cele mai documentate asupra acestei probleme, semnalăm pe cele făcute în Alaska şi Cairo (117) (118), în provincia Québec (121), la St. Augustin (Canada) (120), în Mexico, Guam şi San Francisco (55), la Szeged (R.P.Ungară) (125), în R. P. Polonă (127), la eschimoşii din Pangnirtung, insula Baffin (159) etc. Cercetările acestor autori au dus la rezultate a căror interpretare nu poate satisface pe deplin.

Cajal şi Lissievici-Oprescu (22) (23) studiază prezenţa anticorpilor seroneutralizanţi anti-Lansing la 108 locuitori din oraşul Bucureşti, care nu au prezentat niciodată simptome de poliomielită. Cercetările lor au arătat prezenţa anticorpilor seroneutralizanţi anti-Lansing în 56 din cazurile studiate (51,85%).

Pe grupe de vîrstă, anticorpii cercetaţi au fost întîlniţi după cum urmează :

— între	0	şi	6	luni	în	10	din	11	cazuri	(90,9%)
— „	6	„	12	„	„	0	„	11	„	(0%)
— „	1	„	2	ani	„	3	„	11	„	(27,2%)
— „	2	„	4	„	„	4	„	11	„	(36,3%)
— „	4	„	7	„	„	4	„	11	„	(36,3%)
— „	7	„	10	„	„	6	„	11	„	(54,5%)
— „	10	„	15	„	„	7	„	11	„	(63,6%)
— „	15	„	20	„	„	7	„	10	„	(70%)
— „	20	„	30	„	„	8	„	10	„	(80%)
— peste			30	„	„	7	„	11	„	(63,6%)

Aceste date ne arată în mod sugestiv că la populaţia din Bucureşti, anticorpii seroneutralizanţi anti-Lansing se întîlnesc într-o proporţie foarte ridicată la nou-născuţi, dispar între 6 şi 12 luni, încep să crească treptat, pentru a atinge un prag maxim la grupa de vîrstă de 20—30 de ani, după care procentajul începe să scadă uşor.

Rezultatele obţinute precizează faptul că un număr mare de persoane din centrele populate, deşi nu au avut niciodată poliomielită aparentă clinic, prezintă totuşi anticorpi serici cu acţiune neutralizantă faţă de virusul II (Lansing).

Sînt oare aceşti anticorpi specifici faţă de virusul Lansing? Sînt ei consecinţa unei poliomielite inaparente, cu virus de tip II? Pot fi generaţi în organism de o infecţie poliomielitică cu virus de alt tip? Sau au luat ei naştere, în organism, în urma altor infecţii şi nu sînt decît anticorpi paraimunitari?

La primele 3 întrebări caută să răspundă diverşi autori străini. Astfel, Hammon şi Sather (55), Steigman şi Sabin (143), Sabin (134) Wood şi colab. (159) ca şi Paul şi colab. (117) (118) cred că este vorba de

anticorpi antitip, iar Pavilanis şi Frappier (120) afirmă că apariţia anticorpilor contra virusului poliomielitic de tip II la o populaţie dată ar fi consecinţa trecerii prin acea populaţie a unui virus poliomielitic de tip I; cercetări făcute de aceşti autori într-o epidemie de poliomielită cu virus de tip I ar fi probat această afirmaţie.

Rezultatele obţinute în Institutul de inframicrobiologie păreau a sprijini acest din urmă punct de vedere, cu atît mai mult cu cît în epidemiile ce au continuat în ţara noastră din 1927 şi pînă astăzi, numeroase cercetări, şi în special cele ale lui C. Ionescu-Mihăieşti şi colab. (63) (64) (65), au pus în evidenţă virusuri de tip I şi niciodată de tip II, şi aceasta cu toată incidenţa foarte ridicată a anticorpilor antitip II la populaţie.

Pentru noi este impresionantă raritatea izolării tulpinii Lansing, în contrast cu frecvenţa incidenţei anticorpilor neutralizanţi faţă de această tulpină de virus poliomielitic.

Unele din datele cunoscute ne fac însă să ne întrebăm dacă existenţa acestor anticorpi nu poate prezenta şi o altă semnificaţie. Printre altele, ne referim la constatarea că incidenţa anticorpilor anti-Lansing este mult mai mare la cei ce nu au prezentat în antecedente fenomene poliomielitice, în comparaţie cu vechii poliomielitici. În acest sens, sînt sugestive rezultatele lui Brown şi Francisc (15), care au obţinut 73% rezultate pozitive la martori, faţă de 35% la foştii poliomielitici.

Nu ar putea, oare, toate aceste date să sugereze posibilitatea că unii dintre anticorpii seroneutralizanţi anti-Lansing să fi apărut în organism şi sub influenţa altor cauze decît boala lui Heine-Medin, cu alte cuvinte, să reprezinte în realitate simpli anticorpi paraimunitari?

Merită să fie subliniate şi constatările lui Jungeblut şi Eagle (67), care au descris prezenţa anticorpilor neutralizanţi antipoliomielitici la 4 din 7 maimuţe adulte, ca şi ale lui Schultz şi Gebhard (136) care au găsit aceşti anticorpi în serul unor cai normali.

În acelaşi sens pledează şi materialul expus mai sus, referitor la paraimunizarea antiherpetică în urma poliomielitei.

Cercetări recente făcute de Cajal, Lissievici-Oprescu şi Popescu (24) au dovedit în reacţii de seroneutralizare practicate comparativ faţă de virusul Lansing şi virusul herpetic, la indivizi ce nu au prezentat poliomielită în antecedente, existenţa unui frecvent paralelism între titrul anticorpilor serici antiherpetici şi anti-Lansing.

A fost studiată acţiunea neutralizantă a 20 de seruri umane, faţă de ambele virusuri menţionate. Zece din aceste seruri proveneau de la adulţi în vîrstă de 20—30 de ani, iar 10 de la copii în vîrstă de 6—12 luni. Au fost alese aceste două grupe de vîrstă, fiindcă cercetările anterioare arătaseră lipsa anticorpilor la grupa de vîrstă 6—12 luni, iar serurile de adult utilizate, testate anterior, conţineau toate anticorpi anti-Lansing. Experienţele făcute pe şoareci în condiţii determinate cu virusuri titrate în prealabil au dovedit că 9 din 10 seruri de adult au neutralizat în aceeaşi

măsură atît virusul Lansing cît şi cel herpetic ; al 10-lea ser de adult conţinea numai anticorpi neutralizanţi antipoliomielitici.

Reacţiile făcute cu serurile celor 10 copii au arătat absenţa anticorpilor antiherpetici în toate cazurile şi absenţa anticorpilor antipoliomielitici Lansing în 9 din 10 seruri.

Paralelismul aproape total între frecvenţa anticorpilor anti-Lansing şi antiherpetici în serurile testate a sugerat titrarea comparativă a anticorpilor neutralizanţi faţă de ambele virusuri. Cinci din serurile care în testare s-au dovedit neutralizante atît faţă de un virus cît şi faţă de celălalt au fost utilizate pentru titrarea comparativă ; unul singur a arătat diferenţă între puterea neutralizantă faţă de virusul herpetic şi cel poliomielitic : anticorpii antiherpetici pînă la diluţia de 1/4, iar anticorpii anti-Lansing pînă la diluţia de 1/32. Celelalte patru seruri titrate paralel s-au arătat active în mod egal faţă de ambele virusuri.

Aceste rezultate pun net problema nespecificităţii anticorpilor serici anti-Lansing de la om. Este plauzibil ca anticorpii anti-Lansing, cel puţin de la o parte din cazurile pozitive de seroneutralizare a ambelor virusuri, Lansing şi herpetic, să fie de origine herpetică.

Toate aceste rezultate arată că apariţia în organism a anticorpilor antipoliomielitici Lansing poate fi produsă de virusul omolog, de virusul herpetic, şi chiar de alte virusuri. Paraimunitatea provocată de virusul herpetic împotriva virusului poliomielitic (Lansing) este astfel încă o dată demonstrată.

Ianconescu (62) încercînd să vadă dacă la om, singura gazdă sensibilă în mod natural faţă de virusurile poliomielitice şi herpetic, nu se poate totuşi pune în evidenţă vreo înrudire antigenică între aceste virusuri, studiază 257 de seruri recoltate de la indivizi între 2 luni şi 45 de ani din două regiuni cu morbiditate poliomielitică diferită (oraşul Bucureşti cu mare epidemicitate de poliomielită şi regiunea Cîmpulung-Muscel cu puţine cazuri de poliomielită) ; autorul constată la primul lot cercetat că anticorpii antiherpetici apar foarte precoce şi depăşesc nivelul de 50% la copiii între 1 şi 2 ani şi de 70,9% la vîrstele mai mari ; anticorpii antipoliomielitici tip I au aproape aceeaşi curbă, în timp ce acei de tip II şi III au nivele inferioare anticorpilor antiherpetici şi antipoliomielitici de tip I. Aceste fapte concordă de altfel cu datele epidemiologice şi de laborator aduse de Ionescu-Mihăeşti şi colab. (63) asupra marii răspîndiri a tipului I de virus poliomielitic. S-ar părea deci că există o legătură paraimunitară între virusul herpetic şi cel poliomielitic de tip I, ea fiind exclusă între virusul herpetic şi tipurile II şi III de virus poliomielitic.

Din rezultatele obţinute în seroneutralizările efectuate în raionul Cîmpulung, autorul constată însă că tipurile II şi III de virus poliomielitic predomină. O proporţie de 50% seruri sînt pozitive mai întîi faţă de aceste din urmă virusuri şi numai 1—3 ani mai tîrziu şi faţă de tipul I. Curba anticorpilor antiherpetici s-a dovedit a fi însă mai apropiată de curba

Scanned with OKEN Scanner

anticorpilor antipoliomielitici de tipul II şi III şi aceasta datorită apariţiei mai tardive a anticorpilor antipoliomielitici de tip I.

Aceste fapte i-au permis autorului să considere că între tipul I de virus poliomielitic şi virusul herpetic nu există relaţii antigenice. El a demonstrat însă că anticorpii antiherpetici şi antipoliomielitici sînt prezenţi în acelaşi ser numai în 8% din cazuri în primii 2 ani de viaţă, 41% din cazuri avînd numai unul din aceste tipuri de anticorpi în ser.

La vîrstele mai mari se constată însă o asociere de anticorpi, numărul serurilor cu un singur tip de anticorpi fiind foarte scăzut. Acest fapt îl determină pe autor să considere că apariţia anticorpilor antiherpetici şi antipoliomielitici nu este concomitentă şi nu este legată una de cealaltă şi că, deci, nu poate fi vorba de anticorpi paraimunitari apăruţi în urma contactului cu unul din aceste virusuri. Existenţa unei asociaţii de anticorpi antiherpetici şi antipoliomielitici în acelaşi ser ar fi după autor „urmarea contactului organismului cu fiecare din aceşti inframicrobi".

O dovadă în plus în acest sens este şi aceea că la cazurile cu infecţie herpetică Ianconescu nu a putut evidenţia apariţia anticorpilor antipoliomielitici, dacă aceştia erau iniţial absenţi, sau creşterea titrului lor, dacă ei erau totuşi prezenţi.

S-a demonstrat că imunizările antiherpetice conferă la şoareci o rezistenţă faţă de inocularea intracerebrală a virusului poliomielitic de tip II. Animalele imunizate însă cu virus poliomielitic tip II n-au prezentat decît o creştere mică a rezistenţei faţă de inocularea de probă intracerebrală cu virus herpetic.

Din datele experimentale obţinute, autorul conchide că această rezistenţă nu este bazată pe fenomene de interferenţă sau imunitate umorală, ci ea se datoreşte unor fenomene de paraimunitate celulară.

Vaccinarea antipoliomielitică cu vaccin de tip Salk produce o rezistenţă netă a organismului faţă de herpesul recidivant aritmic.

Această constatare, încă inedită, făcută de Monica Nicolau, face obiectul unei cercetări amănunţite, pe baza unui vast material acumulat în R.S.R. în urma vaccinărilor recente.

Observaţii multiple au fost culese.

În acelaşi ciclu de experienţe, Lotreanu vaccinează antipoliomielitic (vaccin Salk-Lépine) 40 de bolnavi cu herpes cronic recidivant, în special bucal sau genital.

Autorul administrează la bolnavi tineri, 3 injecţii subcutane a cîte 1 ml, la interval de 7—10 zile, iar la cei în vîrstă, 3 injecţii subcutane a cîte 0,5 ml, 0,5 ml şi 0,8 ml la aceleaşi intervale de timp.

S-a putut constata că 52% din aceşti bolnavi nu au mai prezentat recidive, iar 10% au fost ameliorati, în sensul că ei au prezentat recăderi la intervale mari de timp, uneori atipice sau chiar sub forma unui uşor prurit.

Faptul nu poate surprinde, în lumina datelor înşiruite în paragrafele de mai sus ale acestei expuneri. Pe lîngă importanţa teoretică a acestei con-

statări, care din nou atestă paraimunizarea provocată de unul din virusuri contra celuilalt (herpes-poliomielită), importanţa practică nu este neglijabilă. Se cunoaşte malignitatea — uneori pînă la sfîrşit letal — a virusului herpetic recidivant sezonier (cazul Paulian (119)), de asemenea evoluţia lungă şi greu suportabilă a herpesului recidivant aritmic, genital. Or, pînă în prezent, nici o terapeutică — în afara celei chirurgicale — nu a reuşit să juguleze acest fel de herpes. Vaccinul antipoliomielitic apare deci ca un element nou şi eficace, capabil să vindece uneori aceste herpesuri rebele.

3. RELAŢII DE PARAIMUNITATE ÎNTRE HERPES ŞI PSEUDOTURBARE

Sabin (133) arată că cobaii imunizaţi împotriva herpesului capătă o anumită rezistenţă contra bolii lui Aujeszky (pseudo-turbarea); în plus, serul antiherpetic hiperactiv, injectat la cobai, poate să-i protejeze împotriva unor doze mici — dar mortale pentru martori — de virus pseudorabic. Dimpotrivă, serul imun antipseudoturbare nu ar avea acţiune asupra infecţiei herpetice. Autorul conchide că există o „imunitate parţială" între virusul herpetic şi cel ce produce boala Aujeszky. Tot Sabin, în colaborare cu Wright (135), găseşte că maimuţele imunizate împotriva virusului „B" ar fi în parte refractare faţă de virusul bolii Aujeszky. Acest fapt a fost constatat şi de către Weston-Hurst (157).

În experienţele sale de „imunitate încrucişată" între virusul B şi cel al bolii Aujeszky, Sabin dovedeşte că serul antivirus B neutralizează cantităţi mari de virus pseudorabic; cobaii imunizaţi împotriva virusului B rezistă la doze mici de virus pseudorabic; o maimuţă solid imunizată contra virusului B a rezistat la inocularea cu virusul bolii Aujeszky.

4. RELAŢII DE PARAIMUNITATE ÎNTRE HERPES ŞI PARKINSONISM POSTENCEFALITIC

Un alt exemplu de rezistenţă locală, provocată nespecific de un virus împotriva altuia virus care, de data aceasta, preexista în ţesut este vaccinoterapia cu inoculări intrarahidiene de virus herpetic la parkinsonienii postencefalitici sau chiar la encefalitici cu boala acută. Acest tratament a fost aplicat cu bune rezultate de Levaditi (72), Poincloux (126), Nicolau şi Poincloux (109) (110), A. Marie, Souques, Fournier şi Schwartz, Henner (57) etc.

Infecţia nevraxului realizată de germenii herpetici inoculaţi determină o reacţie care se traduce uneori printr-o mică encefalită herpetică, encefalita „în miniatură", benignă. Această nevraxită benignă herpetică stimulează reacţiile tisulare de apărare locală, care reuşesc astfel să lupte eficace, însă nu cu mijloace specifice (Nicolau), împotriva infecţiei preexistente de encefalită letargică acută sau torpidă, trenantă.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. Afzelius-Alm, L. — Acta med. scand, Suppl. 1951, 140.
2. Anderson, S. G., Hamilton, J. — Med. J. Austr., 1949, **1**, 308.
3. Anderson, W. A., Kilbourne, E. D. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1961, **107**, 518.
4. Andervont, H. B. — J. infect. Dis., 1929, **45**, 366.
5. Andrewes, C. H. Carmichael, E. A. — Lancet, 1930, **1**, 857.
6. Barral, R. — Thèse, Lyon, 1963.
7. Bedson, S. P. — Brit. J. exp. Path., 1931, **12**, 254.
8. Bedson, S. P., Bland, J.O.W. — Brit. J. exp. Path., 1928, **9**, 174.
9. Bedson, S. P., Bland, J.O.W. — Brit. J. exp. Path., 1929, **10**, 393.
10. Bedson, S. P., Crawford, G. J. — Brit. J. exp. Path., 1927, **8**, 133.
11. Black, W. C. — J. Pediat., 1942, **20**, 145.
12. Blanc, G., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, **84**, 767.
13. Blanc G., Tsiminakis, J., Caminopetros, J. — C. R. Soc. Biol., 1921, **85**, 290.
14. Brain, E. R. — Brit. J. exp. Path., 1932, **13**, 166.
15. Brown, G. C., Francisc, Th. — J. Immunol., 1947, **57**, 1.
16. Buddingh, G. J. — Sth. med. J., 1946, **39**, 382.
17. Buddingh, G. J., Schrum, D. I., Lanier, J. C., Guidry, D. J. — Pediatrics, 1953, **11**, 595.
18. Burnet, F. M., Freeman, M., Jackson, A. V., Lush, D. — Mex. J. Anat., 1939, **2**, 198.
19. Burnet, F. M., Lush, D. — Lancet, 1939, **1**, 629.
20. Burnet, F. M., Lush, D. — J. Path. Bact., 1939, **49**, 241.
21. Burnet, F. M., Williams, S. W. — Med. J. Austr., 1939, **1**, 637.
22. Cajal, N., Lissievici-Oprescu, El. — III-e Symposion Assoc. europ. Poliomyélite, Zürich, 1955, **3**, 63.
23. Cajal, N., Lissievici-Oprescu, El. — St. cerc. inframicrobiol. microbiol. parazitol., 1956, **7**, 57.
24. Cajal, N., Lissievici-Oprescu, El., Popescu, G. — St. cerc. inframicrobiol., microbiol. parazitol., 1957, **8**.
25. Danielescu, Georgeta — *Studiul interferenței în domeniul virusurilor*, Lucrare de dizertație. București, 1956.
26. Del Campo, A. — G. Med. Infett. parassit., 1958, **10**, 497.
27. Doerr, R., Hallauer, C. — Z. Hyg. Infekt. kr., 1936, **118**, 474.
28. Doerr, R., Kon, M. — Z. Hyg. Infect. kr., 1937, **119** 679.
29. Doerr, R., Schnabel, A. — Z. Hyg. Infekt. kr., 1921, **94**, 29.
30. Doerr, R., Seidenberg, S. — Z. Hyg. Infekt.kr., 1936, **119**, 1935.
31. Doerr, R., Vöchting, R. — Rev. génér. d'Ophtalm., 1920, **34**, 409.
32. Dudgeon, J. A. — J. Clin. Path., 1950, **3**, 239.
33. Findlay, G. M., Mac Callum, F. O. — Lancet, 1940, **1**, 259.
34. Flexner, S., Amoss, H. L. — J. exp. Med., 1925, **41**, 357.
35. Fontana, A. — A 18-a Reun. Soc. ital. dermat. sifiligr. Roma, 15 și 17 decembrie 1921.
36. Fontana, A. — G. ital. Malat. Vener. e Pelle, 1922, fasc. 2.
37. Fontana A. — Patologica, 1922, **14**, 15.
38. Fournier, L., Levaditi, C. — C.R. Soc. Biol., 1928, **98**, 1115.
39. Fowler, M. — Austr. J. exp. Biol. Med. Sci., 1950, **28**, 339.
40. Freund, H. — Zbl. Bakt., 1930, **119**, 25.
41. Gajdusek, D. C., Robbins, M. L., Robbins, F. C. — J.A.M.A., 1952, **149**, 235.
42. Gallardo, E. — Arch. Ophtal., 1943, **30**, 217.
43. Gastinel, P. — Rev. Méd. franç., 1931, **12**, 119.
44. Gastinel, P., Reilly, J. — Bull. Acad. Méd., 1928, **42**, 839.
45. Gay, F. P., Hodlen, M. — J. infect. Dis., 1929, **45**, 415.
46. Gay, F. P., Holden, M. — J.A.M.A., 1931, **96**, 2028.
47. Gildemeister, E., Ahlfeld, J. — Z. Bakt. Abt. I. Orig., 1937, **138**, 325.
48. Gildemeister, E., Herzberg, K. — Dtsch. med. Wschr., 1925, **51**, 1647.
49. Gildemeister, E., Herzberg, K. — Klin. Wschr., 1927, **6**, 603.
50. Greenbaum, S. S., Harkins, M. J. — Arch. Dermat., 1925, **11**, 789.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 7

RELAŢII CU ALTE VIRUSURI

1. RELAŢIA HERPES—VACCINĂ

Dacă se inoculează virusul vaccinal pe corneea iepurelui, se observă în zilele următoare apariţia unei cheratite caracteristice, care evoluează cu timpul spre vindecare, lăsînd pe loc, pentru o anumită vreme, un leucom mai mult sau mai puţin accentuat.

Inoculînd, chiar pe această cornee, două sau trei săptămîni după infecţia vaccinală, virus herpetic, se formează o cheratită herpetică, mai puţin intensă decît la animalele martore. Fapt interesant : utilizînd tulpini de herpes cu virulenţă obişnuită (medie), se constată că majoritatea iepurilor ce avuseseră mai înainte cheratita vaccinală trăiesc, fără să prezinte semne de infecţie nevraxică, consecutive inserţiei virusului herpetic pe cornee ; martorii, inoculaţi pe cornee numai cu herpes, mor toţi de nevraxită caracteristică.

Infecţia vaccinală prealabilă a corneei poate deci să pună la adăpost de infecţia nevraxică iepurii inoculaţi pe aceeaşi cornee cu virus herpetic.

Aceste rezultate i-au îndemnat pe unii autori să susţină ipoteza unei înrudiri oarecare între virusurile herpetic şi vaccinal, bazîndu-se pe experienţele parţial pozitive de imunitate încrucişată (vezi şi cap. paraimunitate — relaţii de paraimunitate între herpes şi vaccină).

Astfel, Zurukzoglu (82), obţinînd aceleaşi rezultate experimentale, spunea : „corneea imunizată împotriva vaccinei, la iepure, posedă o imunitate parţială slabă contra herpesului".

Inversînd premisele experienţei, Gildemeister şi Herzberg (28) au văzut că, la iepure, corneea imunizată solid împotriva herpesului, posedă o „imunitate parţială" împotriva vaccinei ; serul iepurelui imunizat împotriva herpesului s-a dovedit a avea proprietăţi virulicide faţă de virusul vaccinal. Aceiaşi autori au arătat că cobaiul vindecat de o leziune herpetică plantară posedă o rezistenţă parţială faţă de o infecţie locală (pe aceeaşi plantă), provocată ulterior de virusul vaccinal ; la fel, o infecţie anterioară plantară cu virus vaccinal determină o stare de rezistenţă locală împotriva virusului herpetic, inoculat după un anumit timp (29).

Aceste experienţe au fost confirmate de Freund şi Heymann (26) şi de Zurukzoglu (83) (84). O oarecare imunitate pasivă antivaccinală o obţine Freund (25) prin injectarea la cobai a serului antiherpetic.

Scanned with OKEN Scanner

Existenţa unui anumit grad de imunitate încrucişată între herpes şi vaccină a fost acceptat de Zurukzoglu (83) (84), precum şi de Hruszek (36).

Hruszek, ca să dovedească înrudirea strînsă între virusul vaccinal şi cel herpetic, precum şi „imunitatea încrucişată" pe care unul din aceşti germeni o induce contra celuilalt, inoculează la om virus herpetic pe cicatricea vaccinaţiei antivariolice; el obţine erupţii atenuate (fig. 116) în raport cu cele provocate la martorii cu pielea intactă.

Studiind relaţiile imunologice între virusul herpetic şi cel vaccinal, Wagner (78) constată că şoarecii imunizaţi cu unul din aceste virusuri sînt parţial rezistenţi la infecţia cu virusul heterolog şi au anticorpi seroneutralizanţi faţă de acelaşi virus heterolog.

Fig. 116. — Herpes experimental uman dezvoltat pe o cicatrice vaccinală. După Hruszek 1934.

Alţi autori au combătut această teză (6) (54), susţinînd că nu ar fi vorba de o adevărată imunitate încrucişată între aceste virusuri, fapt de altfel precizat încă din 1921 de către Levaditi, Harvier şi Nicolau (43). Ulterior s-a demonstrat că rezistenţa parţială şi locală conferită de un virus faţă de celălalt nu intră în cadrul fenomenelor specifice ale imunităţii ci în cadrul nespecific al paraimunităţii (Nicolau).

Scanned with OKEN Scanner

Între cele două virusuri, herpetic și vaccinal, nu există așadar o imunitate încrucișată (44), după cum nu există nici între acesta din urmă și virusul zonei zoster sau al turbării (60) (48), ci mai ales o rezistență nespecifică, locală, mărită de un prim proces patologic infecțios care, mobilizînd pe loc numeroase elemente de apărare, face terenul parțial impropriu pentru cultura celui de-al doilea germene, introdus după cîtva timp în același loc.

Organismul, în ansamblul său, răspunde la aceste infecții : la rezistența locală nespecifică, tisulară, și care se manifestă contra anumitor germeni (vaccină, herpes) și nu se manifestă împotriva altora (febră aftoasă, herpes), se adaugă și o slabă rezistență nespecifică generală, la distanță de focarul primitiv afectat de prima infecție, *paraimunitatea.*

Această interpretare e susținută de experiența lui Pette (54) care inoculează virus vaccinal pe o cornee și virus herpetic pe corneea opusă, inoculările fiind făcute sau în același timp, sau la intervale variate. Aceste experiențe, ca și altele în care virusul vaccinal era inoculat pe piele, iar cel herpetic pe cornee, au permis autorului lor să admită *absența* imunității încrucișate între cele două virusuri și *prezența unei anumite rezistențe nespecifice* dată de una din infecții împotriva celeilalte ; această rezistență nespecifică este însă slabă.

2. RELAȚIA HERPES—ZONĂ ZOSTER

Luger și Lauda (46) și Seidenberg (68) au demonstrat experimental că lichidul recoltat din veziculele de zona zoster, inoculat pe cornee, nu determină apariția unei imunități a corneei, față de inocularea cu virus herpetic. Ulterior Netter și Urbain (52) constată absența anticorpilor zosterieni fixatori de complement în serul bolnavilor de herpes.

Aceste rezultate au dus la concluzia că aceste două virusuri sînt distincte între ele, deși determină același tip de leziuni cutanate.

3. RELAȚIA HERPES—VARICELĂ

În ceea ce privește relația herpes-varicelă, s-a arătat de către Todorovici (76) și Netter și Urbain (52) că între aceste virusuri nu pot fi evidențiate relații serologice.

Totuși, Kapsenberg (40), cercetînd prezența anticorpilor fixatori de complement față de antigenele varicelă-zoster și herpetic în serurile perechi recoltate de la indivizi cu infecție herpetică primară, ajung la concluzia că între aceste virusuri ar exista o relație antigenică minoră.

De altfel Tournier și colab. (77) descriu electronooptic, în nucleul celulei, particule asemănătoare herpesului cu o dimensiune de 30—40 mμ, înconjurate de o membrană (diametrul corpusculului de 70—110 mμ).

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările lui Almeida şi colab. (2) au demonstrat că virusul are aceeaşi structură cu aceea descrisă de Wildy şi colab. (80) la virusul herpetic *simplex* (corpusculi cu o dimensiune de 200 mμ şi o capsidă formată din 162 de capsomere), fapt care a dus de altfel la încadrarea virusului în grupul herpetic.

4. RELAŢIA HERPES — VIRUS *B* (HERPES *SIMIAE*)

(VEZI HERPES *SIMIAE*)

5. RELAŢIA HERPES — PSEUDOTURBARE

După unele proprietăţi, virsul bolii lui Aujeszky şi virusul „B" se aproprie de virusul herpetic *simplex*, fapt care a permis formularea ipotezei că aceşti trei inframicrobi, astăzi bine distincţi unul de celălalt, ar fi 3 ramuri provenite în decursul secolelor dintr-un virus unic şi adaptate astăzi la viaţa simbiotică a gazdelor diferite : prima, virusul Aujeszky, în organismul porcului ; a doua, virusul „B" la maimuţă ; şi a treia, virusul herpetic *simplex*, la om (10).

S-a arătat de către Sabin (66), prin experienţe de imunitate încrucişată *in vitro* şi *in vivo*, că între virusul herpetic *simplex* şi cel al pseudoturbării există o înrudire antigenică (vezi şi cap. paraimunitate — relaţia de paraimunitate între herpes şi pseudoturbare).

Hurst (37) constată că maimuţele care prezintă anticorpi faţă de virusul herpetic „B" sînt rezistente faţă de infecţia de probă cu virusul pseudoturbării. De asemenea, cultivarea virusului pseudoturbării în oul de găină embrionat (5) şi în culturi tisulare cu producerea de leziuni identice herpesului (plaje de virus pe membrana corioalantoidă, formarea de celule gigante în culturi celulare şi prezenţa de incluzii intranucleare) a determinat pe autori să considere aceste virusuri ca făcînd parte din acelaşi grup.

Totuşi, Kaplan şi Vatter (39), studiind proprietăţile virusului herpetic *simplex* şi cele ale virusului pseudoturbării, cultivate în culturi celulare de rinichi de iepure, constată că deşi ele se aseamănă din punctul de vedere al aspectului morfologic, al sensibilităţii lor la eter şi al aspectului incluziilor intranucleare, ele diferă totuşi prin termostabilitatea lor, prin viteza de adsorbţie şi prin efectele citopatice pe care le produc ; virusul pseudoturbării este mult mai termostabil, viteza sa de adsorbţie pe celule mult mai mare, iar perioada sa de latenţă este de 5 ore în celulele în monostrat şi de 4 ore în suspensia de celule. Pentru virusul herpetic *simplex*, supus aceloraşi condiţii experimentale, perioada de latenţă este însă de 8 ore şi, respectiv, de 5 ore.

În ceea ce priveşte aspectul lezional al celulelor, autorii constată că virusul pseudoturbării provoacă apariţia de sinciţii mari cu mulţi

nuclei, în timp ce virusul herpetic *simplex* produce numai zone de necroză cu prezența de celule rotunde caracteristice.

Prin reacții de seroneutralizare încrucișată autorii nu au putut decela relații antigenice între aceste virusuri.

6. RELAȚII HERPES — VIRUSUL III AL IEPURELUI

Virusul III al iepurelui (virusul herpetic *cuniculi*) (62) (63), prezent sub formă latentă la iepurii din Statele Unite, Anglia și Elveția, este exacerbat prin simple pasaje oarbe. Determină leziuni eritematoase prin inoculări intradermice, orhită și febră prin inoculări intratesticulare, pericardită prin inoculări intratoracice (51) și encefalită prin inoculări intracerebrale (61), procesele inflamatorii și incluziile intranucleare fiind prezente.

Prezența incluziilor intranucleare i-a determinat pe autori să considere acest virus ca făcînd parte din grupul herpetic. Totuși Cowdry (14) arată că există oarecare diferențe între aspectul incluziilor determinate de aceste două virusuri.

De altfel, spre deosebire de herpes, virusul III nu cultivă în culturi celulare obținute din țesuturile de iepure (3) (38) și nu determină incluzii intranucleare pe aceste suporturi celulare.

Nu s-a pus însă în evidență nici o relație antigenică între virusul III și alte virusuri.

7. RELAȚII HERPES — RINOTRAHEITA BOVINĂ INFECȚIOASĂ

Deși s-a demonstrat de către Carmichael și Barnes (11) și Armstrong, Pereira și Andrewes (4) că între virusul herpetic *simplex* și cel al rinotraheitei infecțioase bovine nu există relații antigenice, virusurile au totuși asemănări.

Armstrong, Pereira și Andrewes (4) și Grinyer, Savan și Studdert (32) au arătat că particulele de virus intranucleare au dimensii între 110 și 115 mμ și sînt formate dintr-un nucleoid înconjurat de o singură membrană; particulele din interiorul citoplasmei au două membrane în jur și un diametru mult mai mare (150 mμ).

Cruickshank și Berry (19), Watrach și Bahnemann (79), folosind tehnica contrastului negativ al lui Brenner și Horne, studiază structura virusului și constată că el este format dintr-un nucleoid ce măsoară 945Å, dintr-o capsidă cu 162 de capsomere așezate într-o simetrie axială caracteristică (5 : 3 : 2) și un înveliș.

Din datele aduse de autori reiese că simetria și numărul capsomerelor virusului rinotraheitei bovine este identic cu acela al grupului herpetic.

Scanned with OKEN Scanner

De altfel s-a arătat că acest virus, ca şi ceilalţi membri ai grupului herpetic, este sensibil la eter (31) (73), că determină apariţia de incluzii intranucleare (12) (15) (45) (4) (67) (20), este inhibat de 5-iodo-2-dezoxiuridină (33) (53) şi de 5-bromo-dezoxiuridină şi 5-fluoro-dezoxiuridină(75), fapte ce demonstrează că acest virus conţine ADN.

8. RELAŢII HERPES — RINOPNEUMONITĂ INFECŢIOASĂ ECVINĂ

Din punct de vedere antigenic între virusul herpetic *simplex* şi virusurile herpetice ecvine (virusul rinopneumonitei infecţioase şi virusul catarului acut) nu există nici o relaţie.

Totuşi prin efectul citopatic produs de virusurile herpetice ecvine în culturi celulare (rotunjirea şi balonizarea celulelor, cu formarea de sinciţii şi prezenţa incluziilor intranucleare), prin leziunile produse pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat (pock) şi prin structura corpusculilor elementari, virusurile se aseamănă între ele (57).

9. RELAŢII HERPES — RINOTRAHEITA FELINELOR

Deşi din punct de vedere antigenic nu au fost descrise relaţii între virusul herpetic şi cel al rinotraheitei felinelor, prezenţa incluziilor intranucleare şi inducerea de celule gigante în infecţia cu acest din urmă virus (17) (16) a determinat pe autori să introducă provizoriu virusul laringo-traheitei felinelor în grupul herpetic.

10. RELAŢII HERPES — VIRUSUL BOLII UMANE CU INCLUZII CITOMEGALICE

S-a dovedit că virusul bolii umane cu incluzii citomegalice are acelaşi mod de dezvoltare şi aceeaşi structură cu virusul herpetic (47) (74) (72).

Ambele virusuri sînt de tip ADN (7) (50), au aceleaşi proprietăţi fizico-chimice (conservă la —70°C, sînt sensibile la eter şi inactivate la 56°C în 10—20 min) şi determină apariţia de incluzii intranucleare.

11. RELAŢII HERPES — ENCEFALITĂ NECROZANTĂ

În ultimul timp numărul cazurilor de encefalită necrozantă acută (8) sau de encefalită necrozantă cu incluzii (42) au sporit (30) (24) (13) (71) (1) (59) (27) (18) (22) (70).

Numeroşi autori ca Haymaker şi colab. (35), Seitelberger şi Jellinger (69), Brihaye (9), Seitelberger şi colab. (70), Drăgănescu şi colab. (23), bazaţi pe rezultatele lor, pun în discuţie problema relaţiei dintre herpes şi această formă de encefalită.

Scanned with OKEN Scanner

Semnalată în special în Europa, și mai ales în partea sa de vest, encefalita necrozantă acută apare atît la copil, cît și la adult. După Kriicke (42) ea poate avea o evoluție acută (5—26 de zile), subacută (2—6 luni) sau chiar cronică (1—7 ani).

În forma acută, simptomatologia este caracterizată în genere prin debut brusc, febră, cefalee frontală, somnolență, alterări ale conștiinței, confuzie și depresiune, urmate de crize tonico-clonice, pareză facială, paralizie a vălului sau privirii și mai rar mioclonii facio-brahiale.

În lichidul cefalorahidian se constată o pleiocitoză discretă cu creșterea albuminei și glucozei.

Examenul electroencefalografic evidențiază existența unui focar temporo-parietal de unde delta.

Toate aceste simptome traduc deci un proces encefalitic difuz, uneori predominant unilateral.

Morfopatologic, sînt caracteristice leziunile necrozante din cortex și substanța albă, în special în lobii frontal și occipital și în girusul cinguli, hipocamp, procesele infiltrative perivasculare, proliferările gliale sau nodulare, degenerescențele neuronale și prezența incluziilor intranucleare în neuronii corticali.

Uneori procesul necrotic este absent; sînt însă prezente neuroliza corticală (fig. 117), nodulii neuronofagici și procesele inflamatorii (30) (22) (24). Procesul necrotic, uni sau bilateral, este deci localizat în formațiunile rinencefalice.

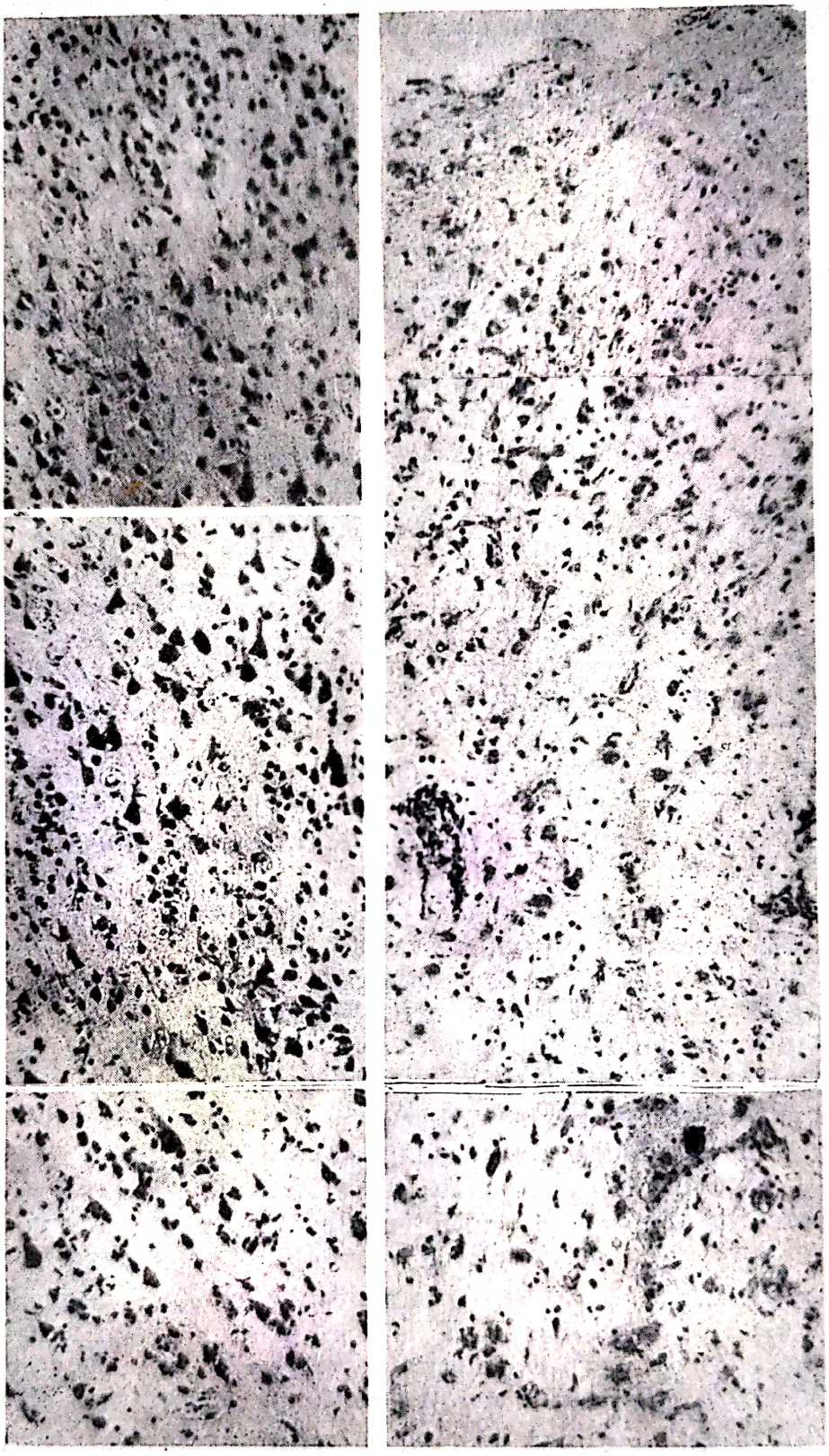
În forma subacută, caracterul clinic este destul de neunitar (uneori mici diskinezii cu secuse musculare faciale și brahiale, urmate de tulburări de deglutiție, redoarea cefei, cianoză; alteori sînt prezente obnubilația, retropulsia, hemitremorul, urmate după 10—14 zile de grețuri, vărsături, tulburări de vorbire și scriere, fenomene afazo-amnestice, crize comițiale, halucinații și reflexe cervicale tonice.

Morfopatologic, se găsesc procese necrotice în cortexul temporal, insulă, girus cinguli, gliază predominant în substanța albă a insulei, lobului temporal și girus cinguli și procese de perivascularită și focare nodulare.

În forma cronică, sînt caracteristice din punct de vedere clinic dezintegrarea profundă cerebrală cu demențiere progresivă.

Lezional, focare necrotice în palidum, capsula internă, nucleul dințat (49) sau în substanța albă a regiunii temporo-rinencefalice, în nucleul amigdalian și cornul Ammon; în unele cazuri sînt prezente aspecte de necroză spongioasă cu distrucția parenchimului cerebral.

Deși din punct de vedere etiologic (izolarea virusului, testarea anticorpilor în dinamică) nu există date suficiente care să ateste etiologia sa herpetică, topografia proceselor necrotice și prezența incluziilor nucleare (identice infecției herpetice) fac pe unii autori (35) (27) (9) (23) să apropie encefalita necrozantă de encefalita herpetică.



a *b*

Fig. 117. — Encefalită necrozantă acută (polioclastică). Parietală ascendentă. În *a* se observă dispariţia pericarionilor corticali şi apariţia de celule ameboide. În *b*, aspect citoarhitectonic normal. St. Drăgănescu şi N. Drăgănescu, 1960.

Scanned with OKEN Scanner

12. RELAȚIA HERPES — ECHO 9

Krech (41) demonstrează că serurile imune preparate cu două tulpini de virus herpetic *simplex* au capacitatea de a neutraliza virusul ECHO tip 9. Aceste rezultate l-au determinat pe autor să considere că virusul herpetic *simplex*, deşi total diferit de virusul ECHO tip 9, este înrudit antigenic cu acesta.

13. RELAȚII HERPES — SCLEROZĂ ÎN PLĂCI

Izolarea unei tulpini (MS) de virus herpetic de la un caz de scleroză în plăci a determinat pe unii autori să considere că între virusul herpetic şi scleroza în plăci ar exista unele relaţii. Studiind această tulpină de virus herpetic, Plummer (55) constată însă că ea este într-adevăr deosebită din punct de vedere serologic de alte tulpini de virus herpetic.

Ross, Lenman şi Rutter (64) nu pot evidenţia prin reacţia de fixare a complementului nici o corelaţie între infecţia herpetică şi scleroza în plăci. Totuşi Plummer şi colab. (57) vorbesc de existenţa anticorpilor neutralizanţi faţă de tulpina MS de virus herpetic în serul bolnavilor cu scleroză în plăci.

Studiile anatomopatologice întreprinse de aceşti autori în infecţia experimentală la iepure cu această tulpină de virus nu au evidenţiat însă prezenţa proceselor demielimizante asemănătoare celor din scleroza în plăci.

14. RELAȚIA ÎNTRE HERPES ŞI TUMORI

O relaţie între herpes şi tumori a fost observată la om. Wyburn-Mason (81) are ocazia de a studia 6 persoane (4 bărbaţi şi 2 femei) între 60 şi 70 de ani, cu carcinoame scuamoase ale buzei. Autorul constată că tumora malignă a fost întotdeauna precedată de leziuni herpetice; doi din ei au prezentat mai multe pusee herpetice recidivante pe acelaşi loc.

Este bine stabilit faptul (10) că infecţia cu virus herpetic are loc în copilărie şi persistă toată viaţa. Testele serologice şi de alergie cutanată au demonstrat acest lucru.

După prima infecţie, virusul rămîne sub formă „biofită" în celulele epidermice care, sub acţiunea diverşilor factori nespecifici (insolaţie, febră, traume etc.), îşi exaltă virulenţa şi determină apariţia recidivelor putînd astfel constitui un element iritativ cronic local.

Cazurile aduse de Wyburn-Mason demonstrează că virusul herpetic *simplex* poate determina o iritaţie şi o inflamaţie cronică la nivelul ţesutului, care pot sta la baza generării acestui carcinom. Apariţia unor neoformaţii pe locul leziunilor herpetice recidivante sugerează posibilitatea existenţei unor relaţii intime între celulă şi acest virus.

Scanned with OKEN Scanner

De altfel Hampar şi Ellison (34) au demonstrat în culturi celulare HeLa alteraţii cromozomiale în celulele în metafază.

Rapp şi Falk (58), inoculînd hamsteri nou-născuţi cu o variantă de virus herpetic, obţin după o perioadă de latenţă de 6 luni apariţia de tumori.

Rous (65) consideră că virusul herpetic, ca şi virusul polioma, adenovirusurile cancerigene, SV40 etc., este „iniţiator", convertind celula normală într-o celulă canceroasă. Odată celula convertită, ea se multiplică autonom pînă la apariţia tumorii, iar virusul dispare din acest ţesut.

Dmochowski (21) arată că în tumorile induse, virusurile pot fi prezente sub formă de particule virale complete sau incomplete, acid nucleic sau proteină specifică.

De altfel cercetările au demonstrat că pentru transformarea neoplazică a unei celule nu este necesară sinteza particulelor virale mature.

Imposibilitatea izolării virusului din tumori ca şi reproducerea unor tumori numai din acizii nucleici extraşi din ţesutul tumoral corespunzător, l-au îndreptăţit pe Nicolau să susţină că numai o porţiune de virion, şi anume acidul dezoxiribonucleic, „infravirus" (artrovirus), este necesară pentru inducerea tumorii. Virusul se găseşte sub formă de molecule de acid nucleic autonomizate şi stabilizate ca atare şi nereversibile în forma primitivă ipotetică corpusculară de virus.

BIBLIOGRAFIE

1. Alajouanine, Th., Grüner, J., Goulon, M., Nehlil, J., Liot, Fr. — Rev. neurol., 1956, **95**, 357.
2. Almeida, J. D., Howatson, A. F., Williams, M. G. — Virology, 1962, **16**, 353.
3. Andrewes, C. H. — Brit. J. exp. Path., 1929, **10**, 188.
4. Armstrong, J. A., Pereira, H. G., Andrewes, C. H. — Virology, 1961, **14**, 276.
5. Bang, F. B. — J. exp. Med., 1942, **76**, 263.
6. Bedson, S. P., Bland, J.O.W. — Brit. J. exp. Path., 1928, **9**, 174.
7. Ben-Porat, T., Kaplan, A. S. — Virology, 1962, **16**, 261.
8. Bogaert, L. van, Radermecker, J., Devos, J. — Rev. neurol., 1955, **95**, 329.
9. Brihaye, J. — Acta neurol. psihiat. belg., 1959, **11**, 1.
10. Burnet, F. M., Williams, S. W. — Med. J. Austr., 1939, **1**, 637.
11. Carmichael, L. E., Barnes, F. D. — Proc. 65th Ann. Mtg. U.S. Livestock Sanit. Ass. Minneapolis, 1962, p. 384.
12. Cheatham, W. J., Crandell, R. A. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1957, **96**, 536.
13. Cordier, J., Henneaux, J. — Acta neurol. psihiat. belg., 1956, **56**, 386.
14. Cowdry, E. V. — Arch. Path., 1930, **10**, 23.
15. Crandell, R. A., Cheatham, W. J., Maurer, F. D. — Amer. J. vet. Res., 1959, **20**, 505.
16. Crandell, R. A. Ganaway, J. R., Nieman, W. H., Maurer, F. D. — Amer. J. vet. Res., 1960, **21**, 504.
17. Crandell, R. A., Maurer, F. D. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1958, **97**, 487.
18. Crawford, A., Robinson, L. — Brain, 1957, **80**, 209.
19. Cruickshank, J. G., Berry, D. M. — Virology, 1965, **25**, 481.
20. Dawson, P. S., Darbyshire, J. H., Loosmore, R. M., Paterson, A. B., Faull, W. B. — Vet. Rec., 1962, **74**, 1379.
21. Dmochowski, L. — Texas Rep. Biol. Med., 1965, **23**, 600.

Scanned with OKEN Scanner

CAPITOLUL 8

DIAGNOSTIC

În diagnosticul de laborator al infecţiei herpetice se folosesc metode indirecte (examenul electronooptic al corpusculilor elementari din lichidul vezicular, imunofluorescenţa, examenul histopatologic al leziunilor cutanale sau mucoase, al creierului şi organelor interne în cazul unei meningoencefalite sau al unei infecţii generalizate) sau şi directe (izolarea şi identificarea virusului) şi de punere în evidenţă a anticorpilor specifici.

Dacă metodele indirecte aduc date orientative, metodele directe şi cele serologice stabilesc în mod cert diagnosticul de infecţie herpetică.

DIAGNOSTICUL ORIENTATIV

1. EXAMENUL ELECTRONOOPTIC AL CORPUSCULILOR ELEMENTARI DIN LICHIDUL VEZICULAR

Pentru punerea în evidenţă a corpusculilor elementari în lichidul vezicular se foloseşte tehnica lui Smith şi Melnick (154); lichidul vezicular diluat în Hanks sau în mediul de cultură este supus unei ultracentrifugări, după prealabila tratare cu un amestec tripsină-chimotripsină, iar produsul rezultat este colorat cu fosfotungstat de potasiu 0,2% sau acetat de uranil 0,2% sau chiar cu amestecul în părţi egale al acestor doi coloranţi şi examinat electronooptic pe grile cu formvar-carbon.

Un aspect hexagonal al corpusculului elementar, cu o structură caracteristică sînt date orientative de diagnostic a infecţiei herpetice.

2. IMUNOFLUORESCENŢA

Tehnica anticorpilor fluorescenţi a fost folosită în diagnosticul infecţiei cu virus herpetic de Biegeleisen, Scott şi Lewis (25). Autorii utilizează ca material de cercetat conţinutul vezicular de la indivizii

Scanned with OKEN Scanner

suferind de herpes cutaneo-mucos, lichidul cefalorahidian în cazurile de meningită limfocitară şi spălăturile nazo-faringiene de la cei cu stomatită herpetică acută. Pe o lamă sînt puse cîteva picături din produsul de examinat, iar după fixare timp de 10 min în acetonă, se face o coloraţie cu serul antifluorescent, după prealabila spălare a lor cu o soluţie clorurosodică fiziologică.

După Biegeleisen şi colab. reacţia are mare specificitate, rezultatele fiind în concordanţă absolută cu cele obţinute prin inocularea produselor patologice pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat.

Aceleaşi rezultate le obţine ulterior şi Kaufman (85) în stabilirea etiologiei herpetice a unor cheratite. După autor, tehnica anticorpilor fluorescenţi este un mijloc rapid de diagnostic al infecţiei herpetice corneene, fiind foarte utilă în diagnosticul formelor latente sau incomplete de virus.

Folosind imunofluorescenţa în diagnosticul infecţiei herpetice, Griffin (68) diferenţiază leziunile veziculare herpetice de altele recidivante.

Metoda lui Weller şi Coons (176) a fost recent aplicată de către Vozza şi Pauluzzi (170) la studiul cherato-conjunctivitei herpetice experimentale la iepure. Autorii au pus în evidenţă cu această ocazie prezenţa de granule fluorescente în nucleul şi citoplasma celulelor infectate. Din acest studiu reiese însă faptul că incluziile intranucleare apar intens colorate la lumina fluorescentă.

3. EXAMENUL HISTOPATOLOGIC AL LEZIUNILOR CUTANATE ŞI MUCOASE

Deşi leziunile din herpes sînt foarte asemănătoare dacă nu identice din punct de vedere histopatologic cu cele din zona zoster şi varicelă, totuşi un examen histopatologic minuţios le diferenţiază şi permite astfel un diagnostic de orientare.

Fragmentele cutanate sau mucoase prelevate după o uşoară anestezie sînt fixate în lichidul Zenker sau Bouin, iar secţiunile obţinute după incluzionare în parafină sînt colorate cu metoda Mann, Giemsa, albastru de metilen oxalat şi fuxină acidă.

Din punct de vedere histopatologic leziunile cutanate şi mucoase sînt similare. Veziculele situate în epiteliul malpighian, fără să intereseze corionul, prezintă în interiorul lor fibrină cu celule epiteliale descuamate şi cîteva polinucleare. Celulele epiteliale ale stratului malpighian ce formează pereţii veziculelor sînt balonizate, cu citoplasma transformată într-o masă fibrinoidă.

În ţesutul stromal se găsesc procesele inflamatorii, cu congestie şi dilataţie capilară.

Prezenţa incluziilor intranuclare înconjurate de un halo clar atestă aproape cu certitudine etiologia herpetică a leziunii.

Scanned with OKEN Scanner

4. EXAMENUL HISTOPATOLOGIC AL PIESELOR NECROPTICE

În cazul unei meningo-encefalite letale examenul histopatologic al creierului are mare importanţă în diagnostic.

În general, aspectul macroscopic congestiv şi focarele necrotice orientează pe cercetător în sensul unei infecţii herpetice.

Leptomeningita cu mononucleare şi leziunile parenchimatoase degenerative cu uşoară infiltraţie perivasculară (uneori aspect de encefalomalacie cu necroză ischemică a celulelor nervoase şi fagocite încărcate cu grăsime) şi existenţa incluziilor în nucleii celulelor nervoase, şi în special în oligodendroglie, stabilesc diagnosticul de encefalită herpetică.

În cazul infecţiei herpetice diseminate, leziunile din pulmon, ficat, cord, splină, suprarenale sînt constituite din zone de necroză de coagulare şi conţin incluzii intranucleare în celulele din jurul lor. În creier, sînt caracteristice leziunile necrotice, în special localizate temporo-hipocampic.

DIAGNOSTICUL DE CERTITUDINE

A. IZOLAREA VIRUSULUI

Boala herpetică umană se traduce printr-o varietate de manifestări clinice, aşa încît prezenţa virusului va fi cercetată în :

— conţinutul şi crustele veziculelor,
— produsul de raclaj al erupţiei herpetice,
— saliva şi spălătura buco-faringiană,
— sîngele (în cazul cînd este vorba de o infecţie primară) recoltat în primele zile de la debutul bolii,
— lichidul cefalorahidian,
— fragmentele de organe (creier, măduvă, ficat, pulmon, suprarenale) prelevate de la cazurile cu sfîrşit letal ;
— fecale,
— secreţii uterine.

1. OBŢINEREA PRODUSULUI PATOLOGIC

Conţinutul vezicular este prelevat din veziculele recent apărute, fie cu ajutorul unui ac de intradermoreacţie montat la o seringă de tuberculină, fie cu o pipetă Pasteur fin efilată. La cantitatea mică de lichid obţinută (0,01—0,02 ml) prin puncţionarea veziculelor, se adaugă prin

Scanned with OKEN Scanner

aspirație aproximativ 2 ml de soluție Hanks sau mediu de cultură celulară. Dacă prelevarea se face chiar în laborator, produsul recoltat va fi inoculat direct pe organismele sensibile. În caz contrar, materialul patologic va fi diluat fie în ser de iepure 1/10, fie, după Scott (148), în tampon fosfat gelatinat (la 1900 ml soluție cloruro-sodică fiziologică 8,5 $g^0/_{00}$ se adaugă 67 ml soluție ce conține 0,2 M Na_2HPO_4 — greutate moleculară 141,98, 33 ml soluție ce conține 0,2 M KH_2PO_4 — greutate moleculară 136,240 și 10 g gelatină, după care totul se încălzește pînă la dizolvare) și transportat în recipiente cu ghiață, virusul fiind foarte ușor degradat de temperatura mai ridicată.

Produsul de raclaj sau crustele veziculare se suspendă în o cantitate mică de diluent (soluție Hanks, mediu de cultură, de tampon fosfat gelatinat, lapte degresat (98)) sau gălbenuș de ou diluat 1/100 în soluție tamponată (185).

Saliva. Se recoltează 5—10 ml fără nici o precauție.

Lichidul cefalorahidian. Se recomandă ca după prelevare în mod aseptic să fie inoculat imediat sau, dacă aceasta nu este posibil, să fie congelat la —20° — —30°C.

Sîngele prelevat în mod steril prin puncție venoasă este lăsat pînă se retractă cheagul; se decantează apoi serul, iar cheagul este mojarat și suspendat în diluent și folosit la inoculări după o prealabilă centrifugare timp de 10 min la 2 000 t/min, sau este conservat la rece în glicerină $50^0/_0$. Serul se utilizează la cercetarea anticorpilor herpetici.

Fragmentele de organe (creier, măduvă, ficat etc.), prelevate la 3—7 ore de la deces (110) cît se poate de aseptic, se mojarează bine și se suspendă în soluție Hanks. Produsul este apoi trecut prin hîrtie de filtru sterilă și clarificat prin centrifugare ușoară.

Aceste produse patogene sînt folosite la izolarea virusului, utilizîndu-se în ordinea preferinței oul de găină embrionat, culturile celulare, șoarecele — în special cel sugar — și iepurele; celelalte animale de laborator (cobaiul, hamsterul, șobolanul de bumbac) sînt folosite în special pentru adaptarea și studiul tulpinilor izolate.

2. INOCULAREA PRODUSELOR PATOLOGICE PE DIVERSE ORGANISME SENSIBILE

a. *Oul de găină embrionat. Membrana corioalantoidă* a oului de găină embrionat s-a dovedit a fi cea mai sensibilă în izolarea virusului herpetic *simplex*. Tehnicile de inoculare pe această cale sînt cele recomandate de Beveridge și Burnet (24) și Buddingh (32).

În mod obișnuit, cînd în produsul patologic există virus herpetic, leziunile membranei corioalantoide sînt vizibile la 48—72 de ore; une-

ori este însă nevoie de efectuarea a 1—3 pasaje oarbe, dat fiind faptul că leziunile nu sînt concludente de la primul pasaj, ele traducîndu-se doar prin cîteva leziuni punctiforme de aspect albicios, de-a lungul vaselor.

Din punct de vedere lezional, membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat infectat pe această cale se prezintă de aspect îngroşat la locul unde suspensia virotică a fost inoculată şi acoperită de leziuni confluente, albicios granulate (aspect perlat), uşor de numărat (149) sau, din contra, dacă virusul este în cantitate prea mare, leziunile au aspectul unor zone opace greu de diferenţiat una de alta.

Beveridge şi Burnet (24) consideră caracteristic aspectul de zonă opacă cu mici necroze centrale, înconjurată de un halo periferic.

Microscopic, membrana corioalantoidă prezintă o îngroşare a ectodermului, necroză şi descuamări de celule, cu prezenţa elementelor inflamatorii în special în mezoderm. Celulele ectodermului prezintă alteraţii nucleare caracteristice infecţiei herpetice (marginaţie cromatiniană şi prezenţa de incluzii eozinofile), descrise de Coriell şi colab. (42), Dawson (46), Anderson (6) etc.

Cu hematoxilină-eozină se constată apariţia incluziilor la 20 de ore de la infectarea cu virus ; ele sînt de aspect omogen şi colorate albăstrui. În acest stadiu al infecţiei incluziile apar Feulgen pozitive, pentru ca la 30 de ore să devină Feulgen negative.

Aceste aspecte histopatologice şi mai ales prezenţa incluziilor din interiorul nucleului celulelor ectodermice şi lipsa unei aglutinări a eritrocitelor de găină, stabilesc în mod cert diagnosticul de infecţie herpetică şi pot diferenţia o infecţie variceliformă Kaposi de una vaccinală.

După Nasemann (116), prezenţa corpilor lui Paschen pe preparatele de membrană corioalantoidă infectată cu virus vaccinal şi absenţa lor pe cele infectate cu herpes este un element important în diagnosticul diferenţial al acestor două infecţii.

b. *Culturile celulare.* După Doane şi colab. (47) şi Beale şi Hair (18), folosirea culturilor celulare în izolarea virusului herpetic *simplex* este cea mai recomandată, datorită rapidităţii diagnosticului. În 8—48 de ore de la inocularea produsului pot apărea leziuni celulare caracteristice (marginaţia cromatinei, incluzii, celule gigante) pe baza cărora se poate pune diagnosticul prezumtiv de infecţie herpetică.

Majoritatea laboratoarelor folosesc pentru aceasta celulele embrionare umane : amniotice (161), fibroblaste (91), renale (16) (47), linii continue de celulele HeLa (47) (141) (178) (168), KB (49), Maben (106) şi amniotice (FL) (43) (76) (117), sau celulele animale, ca cele renale (16) (156), corneene (129) (149) (47) conjunctivale (5), testiculare (8) de iepure, pe fibroblaste (140) şi linia L (54) de şoarece, pe celule renale de maimuţă (16), de pisică (43), de hamster (15) şi pe fibroblaste de embrion de găină (17).

Cele mai recomandate sînt celulele HeLa, KB şi celulele renale de iepure şi hamster.

Scanned with OKEN Scanner

Aderca şi colab. (2) (3) demonstrează în cercetările lor că celulele embrionare umane obţinute prin tripsinizarea embrionilor totali sînt foarte sensibile pentru izolarea virusului herpetic, efectul citopatic caracteristic fiind evidenţiat în primele 48—72 de ore de la inoculare. Folosind mediul de creştere compus din 10% ser de viţel neinactivat, 20% hidrolizat de lactalbumină (din soluţie stoc 2,5%),1% l-glutamină (din soluţie stoc 200mM), 34,5% soluţie Hanks (fără bicarbonat), 34,5% soluţie Earle şi antibiotice (100—200 u.i./ml penicilină, 50—100 μg/ml streptomicină şi 20—40 μ/ml micostatin) se obţine în 4—5 zile o pînză continuă de celule.

Inocularea produsului după ce mediul de creştere a fost înlocuit cu unul de menţinere format din : 96,5% soluţie Earle cu 0,5% hidrolizat de lactalbumină, 2,5% ser de viţel inactivat, 1% l-glutamină (soluţie 200 mM), şi antibiotice duce în mod constant la rezultate foarte bune.

Takemoto şi Lerner (161) constată că în cazul folosirii ca mediu a soluţiei Earle cu 4% ser de cal, virusul herpetic se multiplică rapid în celulele amniotice umane.

Scott (148) recomandă în izolarea virusului celulele HeLa. Cercetînd etiologia erupţiei variceliforme Kaposi, Matumoto şi colab. (104) confirmă susceptibilitatea acestui suport celular în izolarea virusului.

După Kent şi Nicholson (88), folosirea celulelor HeLa şi a celulelor renale de maimuţă sînt deopotrivă de utile în izolarea virusului herpetic *simplex*, ele avînd aceeaşi sensibilitate.

De obicei, în cazul folosirii celulelor HeLa, un mediu de creştere cu hidrolizat de lactalbumină ce conţine 10% ser de viţel şi unul de menţinere cu 5% sau chiar 2% ser de viţel sînt cele mai recomandate.

Eagle şi colab. (49) consideră că în cazul utilizării celulelor KB este indicat un mediu compus din soluţie Earle cu 5% ser de cal.

Mediile folosite pentru izolarea virusului pe celulele renale de iepure sînt mediul sintetic 199 şi mediile semisintetice cu hidrolizat de lactalbumină şi hidrolizat de cazeină.

Pentru a avea o bună creştere a celulelor renale de iepure indicat este ca mediul de creştere să conţină 10% ser de viţel inactivat, şi chiar o mică cantitate (2%) de ser de iepure.

Modul de inoculare a produselor. Lichidul vezicular, recoltat cu seringa sau cu pipeta Pasteur, poate fi inoculat direct în tuburile de cultură ; după inoculare, tuburile se menţin la 35°C şi se urmăreşte în fiecare zi apariţia efectului citopatic. În general, efectul citopatic caracteristic virusului herpetic apare începînd de la 24—48 de ore de la inoculare.

Lichidul cefalorahidian se inoculează după ce mediul de creştere al culturii a fost îndepărtat ; după inoculare (1 ml lichid cefalorahidian în fiecare tub), tuburile de cultură se menţin timp de 2 ore la 37°. După această perioadă de adsorbţie a virusului pe celule, lichidul cefalorahidian este înlocuit cu mediul de menţinere ; tuburile sînt incubate la 35°C şi urmărite zilnic din punctul de vedere al apariţiei efectului citopatic.

Scanned with OKEN Scanner

În cazul suspensiilor de organe se inoculează cîte 0,1 ml în fiecare tub de cultură în care mediul de creştere a fost înlocuit cu mediul de menţinere. Incubarea şi urmărirea efectului citopatic se face ca mai sus.

Leziuni citopatogene. În mod obişnuit, dacă produsul inoculat conţine virus herpetic, cultura celulară prezintă la 2—3 zile leziuni tipice, caracterizate prin rotunjirea şi îngrămădirea celulelor.

Examenul microscopic al preparatelor de cultură fixate în Bouin şi colorate apoi cu Giemsa, hematoxilină-eozină, Mann sau pironină-verde de metil are însă o mare importanţă în diagnosticul infecţiei herpetice.

Balonizarea celulelor, pierderea proprietăţii nucleolului de a se colora în roşu viu cu pironină la cîteva ore de la infecţie, şi apoi dispariţia lui, marginaţia cromatinei şi aspectului de celule gigante multinucleate sînt indicii de infecţie herpetică.

De mare valoare însă în diagnostic este prezenţa incluziilor intranucleare ; în primele stadii ale infecţiei ele sînt de dimensii mici, pentru ca apoi, treptat, prin fuzionarea lor, să apară de dimensii mari ocupînd nucleul în întregime. Ele se colorează eozinofil, sînt omogene ca aspect, avînd un halo ce le separă de cromatina marginală.

Este ştiut că în infecţia cu adenovirusuri apare acelaşi tip de incluzii intranucleare. Caracterul leziunilor nucleare (respectarea nucleolului şi prezenţa vacuolelor) fac uşoară diferenţa între aceste două infecţii.

c. *Iepurele.* Pentru a izola virusul herpetic se utilizează şi iepurele, căile de inoculare corneeană şi cerebrală fiind cele mai sensibile.

Corneea în prealabil scarificată este badijonată cu conţinutul vezicular, cu produsul de raclaj de erupţie herpetică etc. La 12—24 de ore, sau chiar la cîteva zile, apare o congestie a conjuctivei, cu numeroase vezicule în lungul striurilor scarificării, urmată la 1—2 zile de fotofobie şi de apariţia unui exsudat conjunctival purulent, steril bacteriologic, format din celule polimorfonucleare mari şi mononucleare.

După 24—48 de ore, sau chiar mai tîrziu, cherato-conjunctivita se poate complica cu simptome nevraxice, ducînd deseori la moartea animalului după 10—15 zile sau chiar mai rapid (în funcţie de patogenitatea tulpinii).

Encefalul iepurilor morţi de nevraxită herpetică în urma inoculării corneene este bogat în virus. Cu materialul provenit dintr-un asemenea creier se pot face pasaje seriate, de la encefal la encefal ; în cursul primelor serii de pasaje animalele mor în 5—8 zile, pentru ca ulterior fenomenele de nevraxită herpetică să apară în 3—5 zile.

Inocularea lichidului vezicular făcută direct în creierul iepurilor riscă să-i omoare prin meningită aseptică, aşa încît este necesară mai întîi o trecere a produsului pe cornee ; totuşi, inocularea intracerebrală a fost utilizată cu succes de diverşi autori ((27) etc.) în cazul folosirii sîngelui, ţesutului cerebral sau lichidului cefalorahidian.

Scanned with OKEN Scanner

Simptomele de encefalită caracteristică virusului herpetic se observă de regulă după un croşet febril ce apare la 24 — 72 de ore de la inoculare.

Congestia şi infiltraţiile cu elemente poli- şi mononucleare în meninge, procesele perivasculare din parenchim în unele zone (pentru anumite tulpine) sau difuze, constituite predominant din polinucleare, zonele de necroză şi alteraţiile neuronale (nuclei veziculoşi, degenerescenţă oxifilă, cromatoliză, incluzii) sînt specifice infecţiei cu virus herpetic.

d. *Şoarecele.* În cazul unui virus herpetic cu o virulenţă crescută, inoculările intracerebrale la şoarecele adult sînt urmate în mod obişnuit de fenomene encefalitice (excitabilitate, mişcări coreiforme, tresăriri sau sărituri la zgomot, mers spastic, convulsii), cu sfîrşit letal în 10—15 zile de la inoculare; dacă însă virulenţa sa este mai mică, încercările de izolare la şoarecele adult rămîn fără rezultat.

Calea de inoculare intraperitoneală este mai rar urmată de fenomene de encefalită cu sfîrşit letal; ele apar însă după o perioadă de incubaţie mai lungă decît după inoculările intracerebrale.

La şoarecele sugar inoculările intracerebrale sau intraperitoneale determină constant fenomene encefalitice, indiferent dacă virusul are o virulenţă mai mare sau mai mică (89).

Şoarecii sugari în vîrstă de o zi, inoculaţi intraperitoneal cu 0,05 ml, prezintă după 3 zile o stare de hiperexcitabilitate, denutriţie, cianoză, distensie abdominală şi au un sfîrşit letal precedat de paralizii.

Unii autori (88) semnalează faptul că virusul herpetic este uşor izolat de la cazurile de meningo-encefalită herpetică umană prin inocularea intracerebrală la şoarecele sugar şi este greu de izolat pe culturi celulare.

B. IDENTIFICAREA VIRUSULUI

Deşi atît aspectul leziunilor produse de virus la om şi pe organismele sensibile cît şi al incluziilor intracelulare au o mare valoare în diagnostic, totuşi pentru identificarea lui se utilizează testul protecţiei încrucişate, reacţiile de seroneutralizare şi fixare a complementului, imunofluorescenţă, hemadsorbţie, hemaglutinare şi evidenţierea corpusculilor elementari în purificatele de culturi celulare.

1. TESTUL PROTECŢIEI ÎNCRUCIŞATE

Este uşor de realizat, iar rezultatele obţinute au o mare valoare în identificarea virusului.

Iepurii imunizaţi în urma infecţiei corneene sau intraperitoneale cu cîte 1 ml din suspensia herpetică (1/10 creier de şoarece) sau cobaii

imunizaţi pe cale intraperitoneală cu 6—8 doze a cîte 1 ml (suspensie 1/10 creier de şoarece) la interval de 4—5 zile, au un indice de mortalitate foarte redus dacă sînt inoculaţi de probă intracerebral cu virusul izolat, în comparaţie cu animalele neimunizate şi infectate pe aceeaşi cale, în cazul cînd cei doi germeni (cel folosit la imunizare şi cel de identificat) sînt identici.

2. REACŢIA DE NEUTRALIZARE

Testul necesită o titrare prealabilă a virusului de identificat şi obţinerea unui ser de referinţă cu titru cunoscut. Titrarea virusului se face pe şoarecii adulţi sau nou-născuţi, în ou de găină embrionat şi în culturi celulare.

a. *Titrarea virusului pe şoarecii adulţi.* Creierul recoltat de la şoareci cu boala experimentală paralitică este mojarat şi suspendat 1/10 în diluent. Din supernatantul rezultat după o centrifugare de 10 min la 2 000 t/min se fac diluţii de 10^{-1} — 10^{-7}. Începînd cu diluţia cea mai mare, se inoculează intracerebral loturi a cîte 4—6 şoareci cu 0,03 ml din fiecare diluţie. Titrul virusului (LD_{50}) este calculat după metoda Reed şi Muench (128).

b. *Titrarea virusului pe şoarecii sugari* (89). Din suspensia de virus obţinută ca mai sus se fac diluţii pînă la 10^{-7}. Din fiecare diluţie se inoculează intraperitoneal cu 0,05 ml loturi de cîte 4 şoareci sugari. Animalele sînt urmărite timp de o săptămînă. Se notează numărul deceselor începînd de la a 36-a oră după inoculare şi se calculează apoi titrul virusului (LD_{50}) folosind aceeaşi metodă ca cea de mai sus.

c. *Titrarea virusului în oul de găină embrionat. Titrarea pe membrana corioalantoidă.* Ouăle embrionate în vîrstă de 10—13 zile sînt folosite la titrarea virusului pe această cale.

Se foloseşte ca material patogen virus adaptat pe membrana corioalantoidă. După mojarare cu nisip de mare sau pudră de sticlă, emulsia se suspendă 1/10 în diluent iar după centrifugare timp de 10 min la 2 000 t/min, supernatantul este folosit la efectuarea diluţiilor de la 10^{-1} la 10^{-8}.

Cu fiecare din aceste diluţii (începînd cu cea mai mare dintre ele) se inoculează loturi de cîte 4 ouă cu cîte 0,5 ml, iar după 48 de ore de menţinere la 37°C ouăle sînt sacrificate, iar membranele corioalantoide recoltate şi examinate, cu ochiul liber sau cu lupta, pentru stabilirea leziunilor.

După Burnet şi colab. (35) (36) numărul particulelor infectante din suspensia de virus herpetic poate fi apreciată direct prin numărul leziunilor produse pe membrana corioalantoidă, rezultatele fiind exprimate în unităţi formatoare de vezicule (pock).

Scanned with OKEN Scanner

Roizman, Hoggan şi Cornfield (130) folosesc în aprecierea titrului virusului cultivat pe membrana corioalantoidă metoda aproximaţiei lineare şi parabolice, aceasta din urmă fiind mult mai precisă.

Relaţia observată dintre numărul mediu de pustule şi concentraţia virusului corespund aproximativ unei parabole, care este în funcţie neliniară de tipul $y = a + bx + cx^2$, în care a, b şi c reprezintă constante care în cazul de faţă au un caracter empiric; dacă între cele două mărimi y şi x există o relaţie în care pentru o valoare dată lui $y = 0$ corespunde o valoare $x = 0$, înseamnă că parabola trece prin origine, iar ecuaţia ei este de forma:

$$y = bx + cx^2,$$

titrul virusului putînd fi evaluat din tangenta la parabola de origine.

După autori, panta tangentei la $x = 0$ este atunci dată de b, iar diferenţa dintre numărul de particule prin extrapolarea acestei tangente pentru $x = 1$ şi numărul real de particule la acest punct este dat de c.

Valorile b şi c corespund minimului expresiei:

$$\varepsilon\, w(y - bx - cx^2)^2$$

şi sînt date de soluţiile a următoarelor ecuaţii simultane:

$$(\varepsilon\, wx^2)b + (\varepsilon\, wx^3)\, c = \varepsilon\, wxy$$

$$(\varepsilon\, wx^3)b + (\varepsilon\, wx^4)c = \varepsilon\, wx^2\, y$$

în care

$$b = (1/D)\,[(\varepsilon\, wxy)\,(\varepsilon\, wx^4) - (\varepsilon wx^2y)\,(\varepsilon\, wx^3)]$$

şi

$$c = (1/D)[(\varepsilon\, wx^2y)\,(\varepsilon\, wx^2) - (\varepsilon\, wxy)\,(\varepsilon\, wx^3)]$$

D fiind determinantul sistemului de ecuaţii:

$$[(\varepsilon\, wx^2)\,(\varepsilon\, wx^4) - (\varepsilon\ wx^3)^2].$$

Variaţia (măsura preciziei celor doi parametri b şi c) a celor 2 valori este:

$$V(b) = (1/D)\ \varepsilon\, wx^4$$
$$V(c) = (1/D)\ \varepsilon\, wx^2;$$

w este rezultat din valorile mai mult presupuse (evaluate din dreapta calculată prin metoda celor mai mici pătrate sau liber trasă cu mîna după valorile lui y observate) decît observate ale lui y.

Valorile negative ale lui c arată că numărul pustulelor creşte mai puţin decît linear în raport cu creşterea concentraţiei virusului, fapt ce indică utilitatea metodei în evaluarea titrului virusului.

Raportul c/eroare standard a lui c indică un test de semnificaţie al abaterii lui c de la 0.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă $c = 0$, acest raport este distribuit ca mărimea t a lui Student cu grade de libertate egale cu suma gradelor de libertate pe baza cărora s-a făcut estimarea variaţiei.

În cazul de faţă există suficient de multe grade de libertate încît distribuţia este practic normală.

Titrurile se pot calcula din b.

Eroarea standard corespunzătoare evaluării titrului prin metoda celor mai mici pătrate a dreptei este mai mică decît eroarea standard corespunzătoare evaluării titrului din tangenta în origine a aproximaţiei parabolice, deoarece numărul de puncte experimentale utilizate la calculul valorii lui b în cel din urmă caz este mult mai redus decît în primul caz (toate titrările). De asemenea scade şi numărul pustulelor care se iau în consideraţie, deci şi aceasta contribuie la scăderea preciziei în cazul în care se evaluează prin tangenta în origine.

Calcularea numărului de pustule corespunzător unei diferenţe de 10% dintre valoarea titrului pe curbă şi cea de pe tangenta în origine, raportate la valoarea efectivă a titrului, este dată de

$$y = 0{,}09\ \frac{b^2}{c}$$

Sub această valoare, curba parabolică este aproximativ liniară, precum arată exemplele din titrările făcute de autor.

Titrarea intravitelină a fost folosită de Jawetz şi Colleman (80). Din fiecare diluţie de virus se inoculează intravitelin loturi de cîte 6 ouă embrionate în vîrstă de 7 zile. Se notează numai numărul ouălor moarte începînd din a 3-a zi de la inoculare (ouăle sînt urmărite 12 zile) şi în funcţie de aceasta se calculează LD_{50}.

Titrarea în blastoderm. Yoshino (183) şi Yoshino şi colab. (186) utilizează în titrarea virusului herpetic ouă embrionate în vîrstă de o zi, pe care le inoculează în blastoderm.

După marcarea camerei de aer se face un orificu la mijlocul acesteia şi o mică fantă deasupra blastodermului, fără a leza membrana proprie a oului. Se dă oului o uşoară rotaţie în jurul axului său longitudinal şi se introduce la incubator timp de 1 oră pentru ca blastodermul să ajungă în partea superioară a gălbenuşului. Prin fantă se introduc la o adîncime de 6—7 mm cîte 0,2 ml din suspensia 20% de virus obţinută din broiatul de membrana corioalantoidă infectată, diluată într-o soluţie formată din gălbenuş de ou emulsionat într-o soluţie 0,14 M NaCl tamponată cu fosfat 0,01 M pînă la pH 7,4.

Suspensia de virus astfel preparată este încălzită la 35°C înainte de a fi inoculată. Orificiul camerei de aer şi fanta sînt apoi închise prin parafinare, iar ouăle incubate la 35°C în poziţie orizontală, fără a fi rotate.

În cazul care se scoate albuşul după inocularea virusului, tehnica de lucru este următoarea :

Scanned with OKEN Scanner

După efectuarea fantei de deasupra blastodermului, se taie cu freza un disc de 1 cm în diametru fără a atinge membrana proprie a oului. Se inoculează virusul ca şi în tehnica de mai sus, iar apoi se îndepărtează discul şi membrana proprie a oului şi se îndepărtează albuşul prin simpla răsturnare a oului. Se înlocuieşte apoi volumul de albuş scos cu o soluţie de găbenuş încălzită la 35 °C, după care se închide orificiul cu o lamelă parafinată şi ouăle sînt apoi incubate la 35°C.

Titrul virusului astfel cultivat este aproape egal cu acela al virusului cultivat în sacul vitelin al ouălor de vîrstă mai mare.

Titrarea virusului în blastoderm dă însă rezultate mult mai rapide decît pe ouă embrionate în vîrstă de 7 zile (o săptămînă în comparaţie cu 10—12 zile).

Deviaţia standard a titrurilor, folosind 10 ouă pe diluţie de virus, este de 0,3—0,4 log10.

Comoditatea de lucru, rezultatele constante obţinute în titrarea virusului şi rapiditatea rezultatelor au făcut ca această tehnică să fie recomandată de autor în seroneutralizări folosind sistemul doză constantă de virus cu diluţii variabile de ser. După o incubare de o oră la 37°C, amestecul este inoculat pe cîte 5 ouă pentru fiecare diluţie.

d. *Titrarea virusului în culturi celulare.* În titrarea virusului herpetic în culturi celulare se foloseşte metoda diluţiilor limită (DIC 50) şi metoda plajelor.

Metoda plajelor are însă avantajul că dă rezultate mult mai precise; ea a fost descrisă de Farnham (53), Wheeler (178), Waterson (171), Kaverin (86), Tytell şi Neuman (166) etc.

Deşi metoda plajelor prezintă oarecare dificultăţi datorită dimensiilor mici ale plajelor, ceea ce impune de cele mai multe ori folosirea coloranţilor pentru evidenţierea lor, cît şi necesitatea unei pînze continue de celule, ea este totuşi foarte des folosită în laboratoare pentru titrarea virusului, datorită preciziei şi specificităţii ei.

Tehnica lui Kaplan (84). Celulele renale de iepure sînt cultivate în cutii Petri sub atmosferă de CO_2 (5%) în mediu Earle cu 5% hidrolizat de lactalbumină şi 3% ser bovin.

După 3—4 zile de menţinere la 37°C, celulele crescute în monostrat sînt inoculate din diluţiile de virus. Pentru fiecare diluţie se utilizează o cutie Petri; cantităţi de 0,1 ml de virus sînt inoculate pe pînza de celule acoperite cu 0,5 ml SST (soluţie salină tamponată) şi 10% ser de cal inactivat 30 min la 56°.

După inoculare, cutiile Petri sînt menţinute 3 ore la 37°C şi agitate din cînd în cînd.

Stratul de celule este apoi acoperit cu o suspensie de geloză (se încălzesc 2,25 g în 100 ml soluţie 1/10.000 de roşu neutru) răcită la 44°C şi amestecată în momentul utilizării cu mediu Earle dublu concentrată ce

conţine 1% lactalbumină (4 ml geloză + 5 ml mediu Earle + 1 ml ser bovin).

După solidificare, cutiile Petri sînt incubate la 37°C sub atmosferă de CO_2.

Plajele de virus încep să apară a doua zi de la inoculare şi ating dimensia maximă (1—2 mm în diametru) după 4—6 zile.

Tehnica lui Vantsis şi Wildy (168). Se deosebeşte de precedenta prin faptul că autorii utilizează celulele HeLa pe care le cultivă în cutii Petri, iar pentru fiecare diluţie de virus folosesc 5 cutii Petri pe care le inoculează cu cîte 0,5 ml.

După 4 ore de menţinere la 37 °C, perioadă de timp necesară adsorbţiei virusului pe celule, se adaugă 5 ml mediu de menţinere format din soluţie Earle ce conţine o concentraţie dublă de acizi aminaţi fără glutamină, concentraţie dublă de vitamine (fără inozitol care este înlocuit de biotină), 0,45% glucoză, 100 u.i./ml penicilină, 100 μg/ml streptomicină, 50 u./ml neomicină, 100 mg/ml micostatin şi 5% ser de viţel.

După 20 de ore de incubare, mediul este înlocuit cu 5 ml din acelaşi mediu la care se adaugă 20% ser uman care conţine anticorpi antiherpetici.

După 72 de ore de incubare, cultura este fixată cu formol 10% şi colorată cu Giemsa; plajele au o dimensionare de 1—2 mm, sînt vizibile cu ochiul liber şi uşor de numărat.

Tehnica lui Russell (137). Este foarte sensibilă şi precisă. Autorul foloseşte cu aceleaşi rezultate atît celulele HeLa, linia BHK21 de celule renale de hamster sugar, clona C13, cît şi celulele de embrion de găină şi de şoarece.

Metoda constă în aceea că celulele în suspensie sînt mai întîi infectate cu virus şi apoi însămînţate în cutii Petri.

Celulele se obţin prin dispersarea sub acţiunea versenului (0,02 g% în SST fără Ca şi Mg), a tripsinei (0,05 g%), sau a unui amestec de tripsină şi versen (0,05% şi respectiv 0,02%).

După două spălături în mediul Earle cu 10% fosfat triptoză (DIFCO) şi 10% ser de viţel, celulele se suspendă în acelaşi mediu şi sînt etalonate în camera de numărat; cantităţi de $4n \times 10^6$ celule sînt centrifugate, iar depozitul resuspendat în n ml din fiecare diluţie de virus (n reprezentînd numărul cutiilor Petri folosite pentru fiecare diluţie).

După o agitare a suspensiei de celule-virus timp de 20 min la 37°C, se adaugă 4 n ml de mediu de cultură; din această suspensie se repartizează apoi cîte 5 ml/60 mm cutie Petri, după care sînt menţinute la 37°C sub atmosferă de CO_2 (5%).

După 24 de ore se adaugă la fiecare cutie Petri cît 5 ml mediu Earle cu 10% fosfat triptoză şi 10% ser uman ce conţine anticorpi antiherpetici. Se adaugă apoi 15 ml din soluţia 5% sare de sodiu de carboxime-

Scanned with OKEN Scanner

tilceluloză şi 10 ml ser de viţel la 75 ml de mediu Earle concentrat de 1,3 ori.

Plajele ce apar după 2—3 zile pot fi uşor puse în evidenţă cu lupa după colorarea preparatelor cu Giemsa. Ele au o dimensie de 1—2 mm.

Kaplan (84), Osterhout şi Tamm (120), Waterson (171) şi Farnham (53) consideră că numărul de plaje determinat de creşterea virusului pe o pînză continuă de celule în prezenţa sau absenţa gelozei, reprezintă numărul particulelor infectate din suspensia respectivă.

EXECUTAREA REACŢIEI DE NEUTRALIZARE

În identificarea virusului este absolut necesară prepararea pe cobai sau iepure a unui ser antiherpetic; după obţinere, serul trebuie în prealabil titrat faţă de o tulpină de virus herpetic cunoscută.

Serul de referinţă. În reacţia de neutralizare se foloseşte fie ser de om infectat spontan cu virusul herpetic, fie ser obţinut în laborator pe diverse animale.

Serul de om se recoltează la 10—30 de zile de la apariţia infecţiei primare herpetice şi poate fi menţinut în laborator sub formă congelată o perioadă lungă de timp.

Serul de animal se prepară pe cobai şi iepure folosind diverse metode de lucru.

Pentru obţinerea serului pe cobai se utilizează fie calea de inoculare intraperitoneală (113), fie calea intraplantară (21) (73) (48).

Metoda Myers şi Chapman constă din 6—8 inoculări intraperitoneale la intervale de 4—5 zile. Din suspensia 10% de creier de şoarece în soluţie fiziologică se administrează o primă doză de 1 ml, urmată de alte 5—6 doze de cîte 2 ml. Serul recoltat la 5 zile de la ultima inoculare de virus prezintă anticorpi neutralizanţi într-un titru ridicat.

Metoda Bedson constă dintr-o inoculare intraplantară de virus (1 ml din supernatantul suspensiei 10% de virus cultivat plantar, în tampon fosfat M/50, pH 7,6), urmată la 6—7 zile de alte 5—6 inoculări intraperitoneale (2 ml din aceeaşi suspensie). Serul obţinut la cîteva zile de la ultima administrare de virus are un titru ridicat de anticorpi şi poate fi folosit în reacţia de neutralizare.

Metoda Hayward modificată de Dudgeon este utilizată cel mai frecvent în laboratoare. Din suspensia formolată 0,1% de virus herpetic obţinut din leziunile plantare de cobai se fac 4 inoculări în planta cobaiului la interval de 6 zile, urmate de alte 2 inoculări (subcutană şi intradermică) cu virus viu; sîngerare după 6 zile de la ultima administrare de virus.

Hayward recomandă o inoculare intraplantară cu virus viu, urmată la 35 de zile de o alta subcutană cu 1 ml şi de sîngerare după alte 14 zile.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru obţinerea unui ser de referinţă pe iepure, se utilizează diverse procedee.

Animalul se inoculează pe cornee cu un virus herpetic viu ce nu determină moartea (produs de raclaj corneean de la iepurii infectaţi pe această cale sau lichid amniotic din ouăle infectate), iar serul se recoltează la 15 zile după apariţia cheratitei.

Dacă dorim un ser cu un titru mai mare de anticorpi neutralizanţi, această primă infecţie experimentală nemortală se completează cu alte 2 inoculări intraperitoneale cu virus viu, la interval de 2—3 zile. La 5 zile de la ultima administrare de virus se poate face sîngerarea animalului.

În cazul în care virusul este menţinut în laborator sub formă de creier de şoarece sugar sau adult, se inoculează iepuri pe cale intraperitoneală. Animalul face fenomene clinice de encefalomielită, însă serul recoltat la 12—14 zile, sau mai tîrziu, deci cu puţin înainte de moartea animalului, poate fi folosit în reacţia de neutralizare, titrul anticorpilor fiind destul de ridicat.

Tehnica reacţiei de neutralizare este aceeaşi ca cea folosită în diagnosticul serologic al bolii.

3. REACŢIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI

Poate fi folosită în identificarea unui virus herpetic proaspăt izolat (48). Antigenul obţinut fie pe membrana corioalantoidă, fie pe culturi tisulare, are proprietatea de a fixa complementul în prezenţa unui ser antiherpetic cu titru deja cunoscut. Este absolut indicată prezenţa în reacţie a unui ser şi antigen normal.

Halonen şi Tarpila (72) identifică prin reacţia de fixare a complementului 12 tulpini de virus herpetic *simplex* izolate pe celule HeLa.

Testînd antigenele preparate pe celule HeLa, fibroblaste embrionare umane şi celule amniotice umane, autorii constată că ele au titruri foarte înalte şi că deci reacţionează în fixarea complementului cu serul antiherpetic.

Kjellen şi Svedmyr (91) au demonstrat că folosind ca antigen lichidul nediluat de cultură tisulară în prezenţa unui ser de referinţă cu titru ridicat se obţin rezultate din care se poate conchide, chiar de la primul pasaj pe cultură, că este vorba de virus herpetic.

4. IMUNOFLUORESCENŢA

Este o metodă imunochimică foarte des utilizată în diagnosticul de laborator al infecţiilor virale.

Ea a fost folosită de numeroşi autori (44) (149) (66) (96) (119) (133) (175 (76) (107) (83) (127) în studiul infecţiei herpetice experimentale la

Scanned with OKEN Scanner

animal, ou de găină embrionat şi în studiul propagării infecţiei în culturi tisulare (celule HeLa, amniotice umane, renale de pui de şoarece).

În imunofluorescenţă este necesar un ser antiherpetic (ser de om ce conţine anticorpi sau ser anti obţinut pe iepure prin inoculări succesive de virus) şi un ser anti faţă de globulina speciei pe care este preparat serul antiherpetic.

Serul antiherpetic şi antiglobulinic sînt cuplate cu izocianatul de fluoresceină (tehnica lui Coons şi Kaplan (41)) după prealabila adsorbţie cu pulbere uscată de ficat de şoarece.

Pentru obţinerea serului antiglobulinic O'Dea şi Dineen (119) injectează iepuri pe cale intramusculară cu 3,75 ml antigen (2 ml soluţie comercială de globulină umană + 0,25 ml Arlacel A + 1,5 ml Bayol F); după 3 săptămîni de la administrarea antigenului, serul s-a dovedit a avea un titru de 1/25 000.

Prin precipitare cu o soluţie 50% saturată de sulfat de amoniu separă fracţiunea globulinică pe care o cuplează cu izocianatul de fluoresceină după tehnica lui Marshal şi colab. (103).

Lebrun (96) foloseşte ca material de studiu, pentru punerea în evidenţă a virusului herpetic în interiorul celulei, membrana corioalantoidă, creierul de şoarece şi culturile celulare. Pentru aceasta, recoltează produsele la diverse intervale de timp de la inocularea virusului. Secţiunile obţinute la criostat din membranele corioalantoide şi creierul de şoarece (85), cît şi lamelele de culturi celulare, după fixare timp de 10 min în acetonă răcită, sînt uscate timp de 30 min la 37°C şi menţinute alte 30 min în contact cu un ser uman ce conţine anticorpi antiherpetici. După o spălare de 10 min în SST, piesele sînt acoperite cu un ser de iepure antiglobulină umană tratat în prealabil cu pudră, fie de embrion de găină, fie de ficat de şoarece, fie de cultură celulară (în funcţie de ţesutul pe care virusul a fost cultivat) şi cuplat cu fluoresceină. După o spălare de 10 min în SST, preparatele sînt montate în glicerină tamponată şi examinate la microscopul cu fluorescenţă.

Cu ocazia acestui studiu Lebrun demonstrează că în faza precoce a infecţiei cu virus herpetic nucleii celulelor prezintă focare mici de fluorescenţă; în faza avansată a infecţiei aceste focare fluorescente se măresc luînd aspectul unor mase de dimensii mari, pentru ca în faza finală a infecţiei această fluorescenţă să apară şi în citoplasma celulelor.

Pe preparatele neinfectate cu virus, tratate după tehnica de mai sus, şi pe cele infectate dar tratate cu ser uman care nu conţinea anticorpi antiherpetici, autoarea nu constată prezenţa acestei fluorescenţe.

Rezultatele acestor cercetări au determinat-o pe Lebrun să conchidă, de altfel ca şi Crouse şi colab. (44), Lépine şi Sauther (98), Morgan şi colab. (110) (111) (112), că virusul apare şi se multiplică mai întîi în nucleul celulei şi apoi trece în citoplasmă.

Scanned with OKEN Scanner

Studiind cu ajutorul aceleiaşi metode de lucru sediul virusului herpetic în celulele amniotice umane şi renale de şoarece sugar, O'Dea şi Dineen (119) pun în evidenţă numai fluorescenţa periferiei nucleilor, fapt ce-i determină să conchidă că limitarea fluorescenţei la acest nivel s-ar datora nepătrunderii globulinei în interiorul celulei.

Pe secţiuni de creier de şoarece infectat cu virus herpetic şi incluzionat cu parafină, după prealabila fixare în formol, Sabin şi Messore (139) pun în evidenţă o fluorescenţă specifică nu numai în celulele cu incluzii, ci şi în neuronii şi celulele gliale intacte. O constatare interesantă este aceea că incluziile prezente în nucleu nu sînt fluorescente, contrar citoplasmei şi periferiei nucleului celulei în care există această incluzie. Progresiv cu infecţia, nucleul devine în întregime fluorescent şi tot atît de intens ca şi citoplasma.

5. HEMADSORBŢIA

Watkins (172) constată că celulele HeLa infectate cu virus herpetic *simplex* au proprietatea de a adsorbţi hematiile de berbec sensibilizate cu ser de iepure antihematii de berbec.

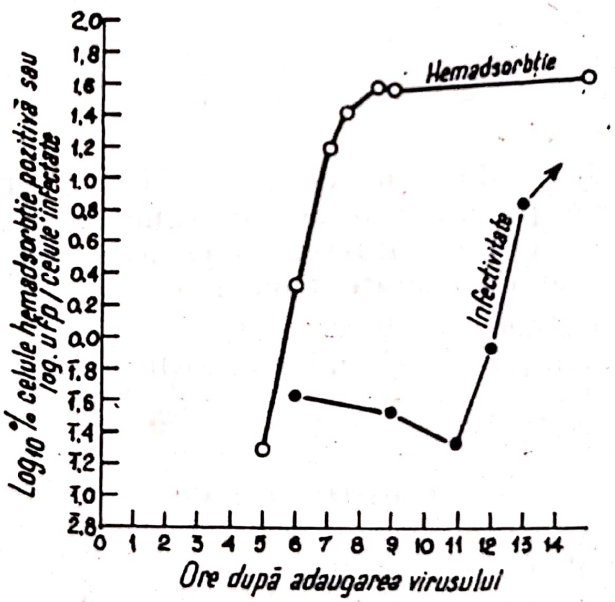


Fig. 118. — Dezvoltarea activităţii hemadsorbţiei şi a virusului infectant în celulele HeLa inoculate cu virus herpetic *simplex*. Watkins, 1965.

Studiind apoi relaţia dintre fenomenul de hemadsorbţie a virusului herpetic şi ciclul său de multiplicare, Watkins (173) demonstrează că antigenul viral apare la suprafaţa celulei după 5 ore de la infectarea celulelor HeLa şi că el este capabil în acelaşi timp de a adsorbi hematiile de berbec sensibilizate (fig. 118).

Fenomenul are loc înaintea apariţiei virusului infectant, fapt ce traduce existenţa la suprafaţa celulei a unui antigen diferit de cel infectant; el determină o modificare a repartiţiei încărcăturii electrostatice a membranei celulare şi în consecinţă o afinitate pentru grupele polare ale anticorpilor.

Cercetările autorului au demonstrat în plus că la iepurele inoculat intravenos cu o singură doză de virus (1 ml) apar în aceeaşi perioadă de timp atît anticorpii neutralizanţi cît şi cei inhibitori ai hemadsorbţiei.

După această descoperire, Espmark (52) aplică hemadsorbţia mixtă în tipizarea virusului herpetic şi în titrarea anticorpilor serici. Cu această metodă se poate stabili un diagnostic rapid, executarea ei făcîndu-se direct în tuburile de cultură.

Autorul foloseşte celulele renale de embrion de om sau de viţel, sau celulele HeLa pe care le cultivă într-un mediu format din hidrolizat de lactalbumină 0,5% în soluţie Hanks cu 5—15% ser de viţel; mediul Parker 199 este utilizat ca mediu de menţinere.

În identificarea virusului se folosesc culturile de celule cu efect citopatic evident; după decantarea mediului de menţinere, celulele infectate cu virus sînt spălate o singură dată în mediul de menţinere. Se pun apoi în fiecare tub de cultură 0,3 ml din diluţia 1/100 ser antiherpetic preparat pe cobai. După contactul de o oră la temperatura camerei serul se decantează şi cultura se spală o singură dată cu o cantitate mare de mediu de menţinere.

Cîte 0,5 ml din soluţia de hematii-indicator[1] se adaugă în fiecare tub de culturi, iar după jumătate oră se examinează la microscop; rezultatul pozitiv al reacţiei este caracterizat printr-o adsorbţie a hematiilor-indicator pe celulele degenerate (fig. 119).

Rapiditatea obţinerii unui rezultat (în 2—3 zile fiind posibilă identificarea virusului) impune fără îndoială utilizarea sa în toate laboratoarele de specialitate.

6. HEMAGLUTINARE

Este ştiut faptul că multe din virusurile cunoscute astăzi au proprietatea de a aglutina eritrocitele, adică posedă o hemaglutinină. În herpes însă nu s-a putut decela, pînă în momentul de faţă, prezenţa unei hemaglutinine.

---

[1] Suspensia 2% de hematii de berbec se amestecă în părţi egale cu ser antihematii de berbec, preparat pe cobai; după o oră de contact la temperatura laboratorului, hematiile sînt spălate de două ori în SST pH 7,4 şi apoi resuspendate în aşa fel încît să obţinem o suspensie 2%; un volum din această suspensie se amestecă cu un volum din diluţia 1/30 ser preparat pe iepure faţă de gamaglobulina de cobai; după 2 ore de menţinere la temperatura camerei eritrocitele se spală o dată într-un volum mare de SST şi se resuspendă apoi în concentraţie de 2%.

Scanned with OKEN Scanner

S-a demonstrat însă faptul că eritrocitele, tanate şi tratate cu un antigen oarecare, aglutinează în prezenţa anticorpilor specifici.

Scott, Felton şi Barney (151) caută să aplice această metodă indirectă în diagnosticul infecţiei cu virus herpetic *simplex*. Ulterior Felton

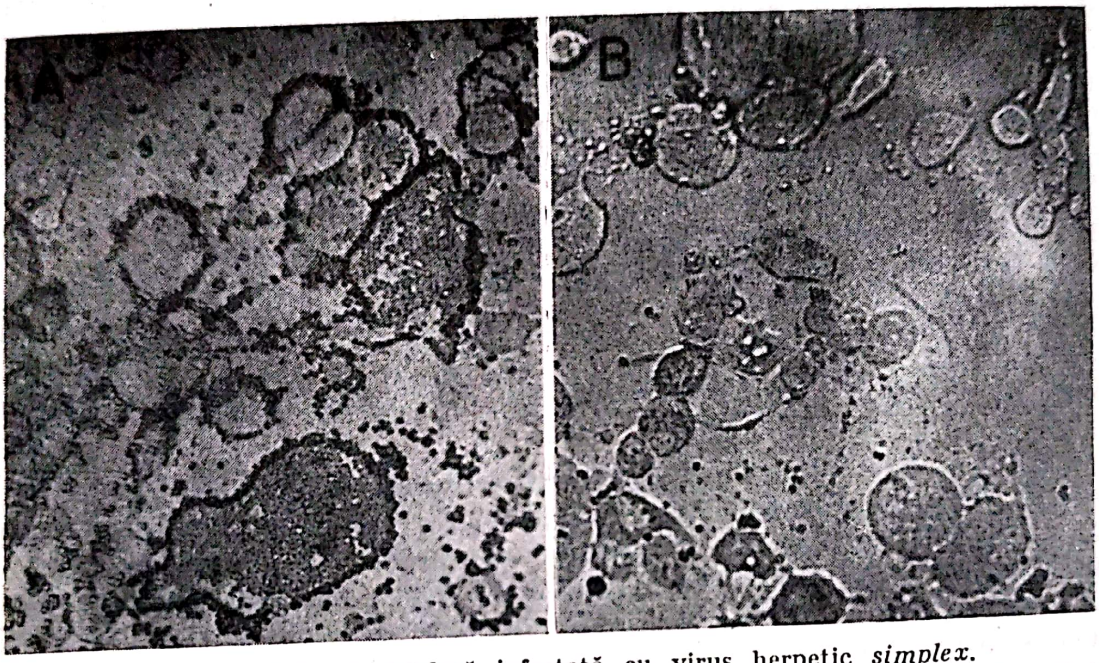


Fig.119. — Cultură celulară infectată cu virus herpetic *simplex*.
A. Cultură tratată cu ser anti herpetic (diluţia 1/100). Se observă prezenţa hemadsorbţiei.
B. Cultură tratată cu ser normal de om (diluţia 1/10). Se observă absenţa hemadsorbţiei.
Espmark, 1965.

şi Scott (55) (56) studiază condiţiile ce trebuie îndeplinite pentru executarea reacţiei. Autorii stabilesc cu această ocazie dimensia eprubetelor, timpul şi temperatura de incubaţie, concentraţia de acid tanic, timpul de expunere a virusului cu hematiile tanate, pH-ul necesar sensibilizării hematiilor, originea hematiilor şi a serului utilizat ca diluent şi metodele de preparare şi conservare a antigenului.

Ca antigen, autorii utilizează lichidul alantoidian recoltat de la ouăle de găină embrionate infectate cu virus herpetic pe cale intravitelină, pe care îl purifică şi-l concentrează prin centrifugări diferenţiale (supernatantul obţinut prin centrifugarea lichidului alantoidian timp de 15 min la 2 000 t/min este centrifugat apoi timp de 2 ore la 19 500 t/min). Sedimentul obţinut este resuspendat în soluţia fiziologică tamponată pH 7,2 (0,15 M NaCl amestecat în părţi egale cu soluţia de 0,15 M Na_2HPO_4 + 0,15 M KH_2PO_4) şi supus unui ciclu de alte 4 centrifugări; ultimul sediment este resuspendat în aceeaşi soluţie fiziologică tamponată, într-un volum de 10 ori mai mic decît volumul lichidului alantoidian de la care s-a pornit.

Ca *eritrocite*, autorii utilizează hematiile de berbec. După 3 spălări în soluţia fiziologică tamponată şi centrifugări la 2 000 t/min timp de 10 min, suspensia de hematii 2,5% este amestecată în părţi egale cu acid tanic 1/20 000 şi incubată timp de 10 min, la 37°C. După centrifugare, sedimentul obţinut este spălat în soluţie fiziologică tamponată şi recentrifugat, iar depozitul de hematii se resuspendă în aceeaşi cantitate de soluţie fiziologică tamponată.

Pentru *sensibilizarea hematiilor tanate*, se amestecă 4 volume din soluţia de tampon fosfat pH 6,4 (0,15 M NaCl + 0,15 M Na_2HPO_4 + + 0,15 M KH_2PO_4, amestecate în aşa fel încît să dea pH 6,4) cu 1 volum de virus purificat şi concentrat şi 1 volum de hematii tanate. Amestecul este apoi incubat 15 min la temperatura camerei; după o centrifugare, sedimentul se spală în 2 volume ser de iepure normal diluat 1/100 (serul este în prealabil inactivat şi adsorbit pe hematii tanate). Sedimentul obţinut după centrifugare se resuspendă în ser diluat.

Hematiile astfel sensibilizate pot fi conservate la 5°C şi utilizate după 48 de ore de la preparare.

Serul anti se obţine pe iepure prin inoculări subcutanate din suspensia de creier de şoarece infectat. Este recomandat ca la imunizarea animalelor să se folosească, la primele administrări, virus inactivat prin formol şi apoi să se treacă la inoculări cu virus viu. Serul recoltat la o săptămînă de la ultima injecţie vaccinantă este inactivat timp de 30 min la 56°C şi apoi este tratat cu hematii de berbec tanate pentru îndepărtarea aglutininelor nespecifice.

Executarea reacţiei. Se repartizează în tuburi cîte 0,5 ml din diluţiile seriate de ser (normal şi imun) în soluţie fiziologică tamponată şi apoi se adaugă la fiecare diluţie cîte 0,5 ml din hematiile sensibilizate. Citirea rezultatelor se face după menţinerea amestecului timp de 4 ore la temperatura camerei sau 16 ore la 5°C.

Reacţia pozitivă constă din depunerea hematiilor sub forma unui strat uniform pe fundul tubului, iar cea negativă sub forma unui buton rotund.

În reacţie sînt absolut necesari următorii martori:

1) ser diluat + hematii tanate

2) lichid alantoidian normal (concentrat identic ca antigenul virotic) + hematii tanate

3) antigen virotic + hematii de berbec netratate cu acid tanic

4) hematii de berbec netanate.

S-a precizat de către Scott şi colab. şi Felton şi Scott că hemaglutinarea este o reacţie antigen-anticorp specifică.

Ea este însă o metodă indirectă şi nu are încă o aplicabilitate practică în infecţia herpetică.

Scanned with OKEN Scanner

7. EVIDENȚIEREA CORPUSCULILOR ELEMENTARI ÎN LICHIDUL DE CULTURĂ CELULARĂ

Virusul herpetic cultivat în culturi celulare (celule HeLa) este ușor evidențiat prin următoarele tehnici :

1) *Tehnica lui Wildy, Russell și Horne* (180). După purificarea prin cromatografie pe coloană de fosfat de calciu, virusul adsorbit pe coloană este spălat cu tampon fosfat 0,1 M și eluat în tampon fosfat 0,4 M, iar apoi produsul rezultat este dializat contra apei distilate timp de 18 ore la +4°C. Depozitul obținut după centrifugarea produsului timp de 30 min la 60 000 t/min este colorat cu fosfotungstat de potasiu 2%, pH 7 și examinat electronooptic pe grile acoperite cu carbon.

Evidențierea unei structuri corpusculare formate din nucleoid, capsidă și înveliș aduce date prețioase în diagnosticul de orientare.

2) *Tehnica lui Norcross, McCrea și Angerer* (118) constă în purificarea virusului cultivat pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, folosind metoda gradienților de densitate de fluorocarbon și tartrat de potasiu.

Membranele corioalantoide, recoltate la 48 de ore de la infectarea lor cu virus, se amestecă cu 1/2 volum de „genetron 113" răcit la —10°C și se omogenizează timp de 1 min la 15 000 t/min.

După centrifugare, supernatantul (S_1) este recoltat, iar la depozitul obținut se adaugă un volum egal din amestecul de tampon fosfat cu 1/2 volum „genetron".

Supernatantul (S^2), rezultat din centrifugarea a doua, este unit cu supernatantul de la prima centrifugare și tratat succesiv cu două cincimi și o treime volum de „genetron".

Supernatantul (S_3) concentrat de 10—20 de ori prin dializă contra apei distilate la +4°C este apoi purificat prin centrifugarea în gradientul densității de tartrat de potasiu. După 24 de ore de menținere în tartrat, produsul se centrifughează 2—3 ore la 24 000 t/min.

După îndepărtarea tartratului prin dializă sau spălări repetate, examenul electronooptic pune în evidență prezența de corpusculi elementari cu capsidă și aranjament regulat al capsomerelor (fig. 120).

3) *Tehnica lui Watson, Russell și Wildy* (175) permite numărarea particulelor virale din purificate. Ea constă în amestecul în părți egale a diluției de virus cu o suspensie standard de latex cu fosfotungstat și 1% albumină serică. Examinarea se face pe grile acoperite cu carbon, iar particulele virale se compară cu cele de latex.

4) *Tehnica lui Watson și Wildy* (175) constă din amestecul suspensiei virotice cu serul anti care provoacă o aglutinare a particulelor goale, fără înveliș. Folosirea unui ser anticelulă gazdă determină aglutinarea particulelor cu înveliș, fapt ce demonstrează că acest înveliș provine din celula gazdă.

Scanned with OKEN Scanner

DIAGNOSTICUL SEROLOGIC AL BOLII

Pentru a avea un diagnostic serologic cît mai exact sînt necesare două probe de sînge : una recoltată la începutul bolii şi cealaltă în convalescenţă (la 3—4 săptămîni de la debut). Serurile pot fi menţinute la

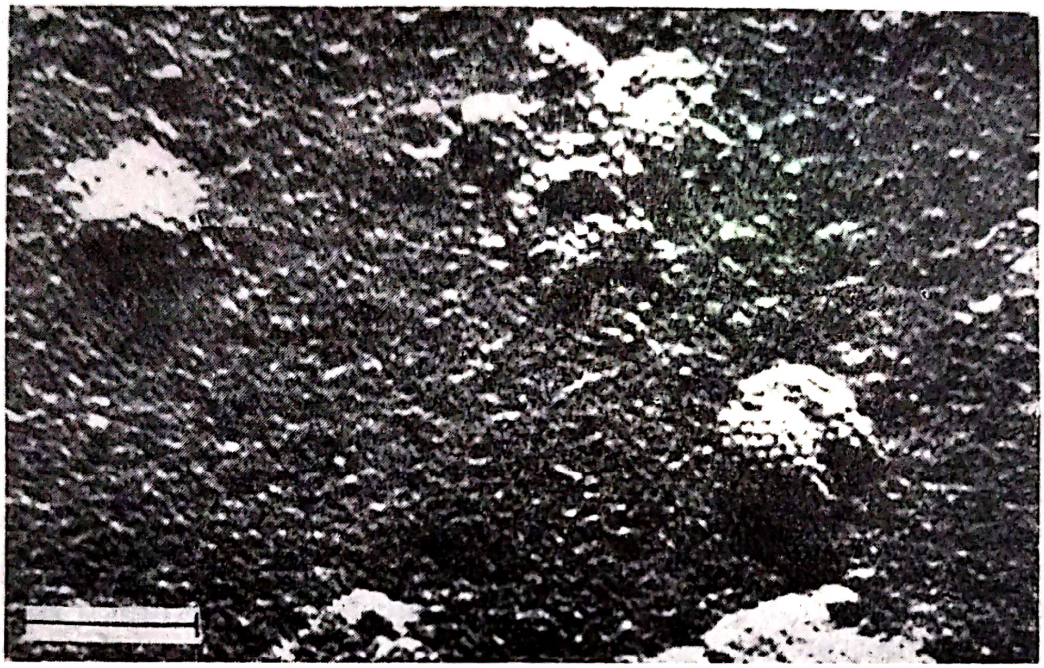


Fig. 120. — Virus herpetic *simplex* tratat cu fluorocarbon şi centrifugat $2^1/_2$ ore în gradient de densitate de tartrat de potasiu. Se observă aranjamentul simetric al capsomerelor. Norcross, McCrea şi Angerer, 1963.

—20°C, fără adaos de conservant, pînă în momentul efectuării reacţiilor serologice.

În diagnostic, sînt utilizate reacţiile : de precipitare, de neutralizare, fixare a complementului, hemadsorbţie mixtă şi alergie cutanată.

A. REACŢIA DE PRECIPITARE

Se foloseşte pentru decelarea anticorpilor precipitanţi, tehnica de lucru fiind cea recomandată de Oudin (122) şi Ouchterlony (121). Punerea în evidenţă a acestor anticorpi se face prin difuzia în gel.

Datorită rapidităţii diagnosticului, această metodă a fost aplicată de Mäntyjärvi şi Arvilommi (102) pentru punerea în evidenţă a anticorpilor precipitanţi în serurile umane şi de Evans şi Dick în stabilirea etiologiei herpetice a unor faringite şi amigdalite.

Tokumaru (165) constată că virusul herpetic cultivat în culturi de celule renale de iepure conţine antigene precipitante cu care se poate pune în evidenţă prezenţa anticorpilor în herpesul primar sau recidivant.

Scanned with OKEN Scanner

Studiind distribuţia anticorpilor precipitanţi în serurile a 671 de bolnavi, autorul obţine date care atestă valabilitatea tehnicii în diagnosticul infecţiei herpetice.

Ca şi Evans şi Dick, autorul pune în evidenţă cu această metodă o incidenţă destul de mare a infecţiilor herpetice primare şi recidivante ale tractului respirator. Apariţia benzilor de precipitare cu serul convalescenţilor la care prin reacţiile de fixare a complementului şi de seroneutralizare nu pot fi decelate diferenţe între serul din cursul bolii precoce şi tardive constituie un bun criteriu de diagnostic.

Cercetările autorului au demonstrat însă că sensibilitatea tehnicii depinde de concentraţia antigenului; un antigen concentrat poate decela acelaşi procent de reacţii pozitive obţinute prin reacţia de fixare a complementului.

Reacţia are însă dezavantajul că necesită concenntraţii mari atît de antigen cît şi de anticorpi aşa încît ea are aplicabilitate mai mult în cercetări experimentale.

B. REACŢIA DE SERONEUTRALIZARE

A fost utilizată încă de mult în punerea în evidenţă a anticorpilor herpetici, atît la animalele trecute prin boala experimentală cît şi la indivizii umani.

Cercetările întreprinse de Zinsser şi Tang (182), Andrewes şi Carmichael (9) şi Hudson, Cook şi Adair (78) nu au putut însă demonstra diferenţe cantitative în ceea ce priveşte titrurile anticorpilor neutralizanţi din serurile umane. Ulterior Burnet (37) emite teoria „totul sau nimic" în ceea ce priveşte răspunsul anticorpilor neutralizanţi în urma infecţiei herpetice.

Kilbourne şi Horsfall (89) demonstrează totuşi o creştere progresivă a anticorpilor neutralizanţi în serul bolnavilor cu herpes, însă numai atunci cînd se foloseşte metoda doză constantă de virus cu diluţii seriate de ser.

În cercetările lor, Rose (131) şi Buddingh (32) obţin diferenţe în capacitatea de neutralizare a serurilor de bolnavi cu herpes.

Reacţia de neutralizare poate fi executată pe animale, în oul de găină embrionat şi pe culturi celulare.

1. SERONEUTRALIZAREA PE ANIMALE

Inocularea amestecului ser-virus pe iepure. Levaditi şi Harvier (100), Flexner (57), Luger şi Lauda (101) au fost printre primii care au efectuat testul de seroneutralizare prin inocularea amestecului de ser-virus pe cale corneeană sau intracerebrală la iepure.

În 1925, Flexner şi Amoss (58) descriu o tehnică de seroneutralizare cu care obţin rezultate foarte bune. Ei folosesc serul de iepure trecut prin boala experimentală herpetică pe care-l amestecă cu suspensia cerebrală de la aceeaşi specie animală infectată cu virus herpetic. După menţinere timp de 1/2 oră la 37°C sau peste noapte la +4°, amestecul este inoculat intracerebral la iepure, iar capacitatea neutralizantă a serului este exprimată prin numărul de animale moarte.

Aceeaşi tehnică a fost aplicată la studiul anticorpilor neutralizanţi în serul uman cu rezultate de asemenea bune.

Ulterior, Zinsser şi Tang (181), utilizînd testul de neutralizare prin inocularea amestecului ser-virus pe cale intracerebrală la iepure, demonstrează că virusul herpetic nu este influenţat de serul normal. Inoculînd iepurii intracerebral cu amestecul virus-ser imun, după prealabila incubare timp de 5—6 ore la 37°C, ei dovedesc că anticorpii neutralizanţi apar în sîngele iepurelui numai după administrarea virusului viu.

Folosind această metodă pentru studiul anticorpilor herpetici la oamenii normali, Zinsser şi Tang constată prezenţa lor în 59% din aceştia.

Schultz şi Hoyt (146) utilizează de asemenea testul de neutralizare prin inoculări intracerebrale la iepuri pentru decelarea anticorpilor în serul iepurilor imunizaţi.

Inocularea amestecului ser-virus pe cobai. Bedson şi Crawford (23) folosesc cobaiul în testul de neutralizare. Inoculînd pe pielea epilată amestecul de virus-ser autorii constată că serul cobaiului trecut prin boala experimentală conţine anticorpi neutralizanţi începînd de la a 7-a — a 10-a zi de boală. Cu această ocazie autorii arată că prin hiperimunizarea iepurelui este posibilă o creştere a titrului anticorpilor seroneutralizanţi.

Gay şi Holden (61) inoculează pe piele la cobai amestecul virus-ser anti şi obţin rezultate bune; neutralizarea virusului de către serul anti respectiv se traduce prin lipsa leziunilor specifice la locul inoculării.

Inocularea amestecului ser-virus pe şoarecele adult. Testul de seroneutralizare pe şoarece a fost utilizat de către Weyer (177). Autorul amestecă în părţi egale suspensia 5% de creier de şoarece infectat, cu ser antiherpetic nediluat pe care, după menţinerea timp de o oră la temperatura camerei, îl inoculează intracerebral la şoarece; lipsa anticorpilor neutralizanţi în serul respectiv se traduce prin moartea animalelor cu fenomene de encefalită.

Tehnica pe şoarece a fost aplicată de către Weyer în studiul incidenţei anticorpilor antiherpetici la om pe diverse grupe de vîrstă, şi de către Hudson, Cook şi Adair (78) în studiul relaţiei anticorpilor antiherpetici cu sexul, sarcina şi ciclul menstrual.

Gildemeister şi Ahlfeld (63) inoculează însă subcutan la şoarece serul de cercetat şi administrează la cîteva minute după aceea virus herpetic pe aceeaşi cale; cu această tehnică de lucru, autorii evidenţiază însă o incidenţă foarte mică a anticorpilor în serurile oamenilor normali.

Scanned with OKEN Scanner

Scott, Steigman şi Convey (152) pun însă la punct o metodă mult mai bună de neutralizare pe şoarece. Autorii fac în bulion diluţii binare de virus, pe care le amestecă în părţi egale cu serul respectiv nediluat. După menţinerea timp de o oră la temperatura camerei şi 3 ore la gheţar, amestecul este inoculat intracerebral la şoarece, iar rezultatul neutralizării îl calculează după metoda Reed şi Muench.

Ulterior, Black (26) şi Armstrong (10) utilizează aceeaşi metodă de lucru în cercetarea anticorpilor herpetici.

Ruchman, Welsh şi Dodd (136) şi Ruchman şi Dodd (135) folosesc o variantă a acestei tehnici de neutralizare şi obţin rezultate foarte bune.

Virusul herpetic, sub formă de creier de şoarece infectat, suspendat în soluţie fiziologică cu 10% ser de iepure, este diluat 1/5—1/5 000 000. Din fiecare diluţie se repartizează cîte 0,15 ml în cîte o eprubetă ale celor două rînduri notate cu N şi M.

În fiecare eprubetă din rîndul notat cu N se adaugă cîte 0,15 ml din serul de cercetat nediluat, iar la rîndul notat cu M aceeaşi cantitate din lichidul diluent (soluţie fiziologică cu 10% ser de iepure).

După 2 ore de menţinere la 37°C se inoculează intracerebral cîte 0,02 ml din fiecare diluţie la loturi de 4—6 şcarcci. Animalele sînt urmărite timp de 20 de zile, după care se calculează indicele de neutralizare al serului (metoda Reed şi Muench); el este reprezentat de antilogaritmul diferenţei între logaritmul LD_{50} al şoarecilor care au fost inoculaţi cu amestecul virus + serul de cercetat şi logaritmul LD_{50} al şoarecilor martori.

Tehnicile de lucru folosite de Burnet şi Lush (36), Paul (123), Shaffer şi colab. (153), Gajdusek şi colab. (60) sînt aproape aceleaşi ca cea a lui Ruchman şi colab.

Inocularea amestecului de ser-virus pe şoarecele sugar (*Scott*, (148). După amestecul în părţi egale a diluţiilor crescînde de ser (1/4, 1/8 etc.) cu o doză constantă de virus (50 LD_{50}) şi menţinere timp de 5—10 min la temperatura laboratorului, se fac inoculări intracerebrale, pe loturi de cîte 6—8 şoareci sugari din fiecare diluţie. Se notează numărul animalelor moarte între a 2-a şi a 7-a zi de la inoculare şi se calculează apoi indicele de neutralizare după metoda lui Reed şi Muench.

2. SERONEUTRALIZAREA ÎN OUL DE GĂINĂ EMBRIONAT

Inocularea amestecului ser-virus pe membrana corioalantoidă. Testul de neutralizare pe membrana corioalantoidă a fost pus la punct de Burnet şi Lush (36) (38).

Autorii folosesc în reacţie atît virusul nediluat cît şi diluat (o diluţie de virus care inoculată pe membrana corioalantoidă să determine leziuni herpetice punctiforme uşor de citit).

Scanned with OKEN Scanner

Reacţia se execută pe 3 rînduri de eprubete; în eprubetele din primul rînd se pun cîte 0,2 ml din virusul nediluat, iar în eprubetele rîndului 2 şi 3 cîte 0,2 ml din virusul diluat.

La cantitatea de virus repartizată în eprubetele rîndurilor 1 şi 2 se adaugă apoi 0,2 ml ser de cercetat, iar în eprubetele rîndului 3 aceeaşi cantitate de ser normal. După menţinere timp de 2 ore la 4°C, cantităţi de cîte 0,05 ml din fiecare eprubetă sînt inoculate pe membrana corioalantoidă a ouălor de găină embrionate (loturi de cîte 4 ouă pentru fiecare din eprubete cu amestec virus-ser). După 40 de ore de menţinere la 37°C ouăle sînt sacrificate, iar membranele corioalantoide prelevate şi examinate din punct de vedere lezional.

Capacitatea de neutralizare a serului se calculează raportînd numărul de leziuni punctiforme apărute pe membranele corioalantoide ale ouălor inoculate cu amestecul de virus-ser normal (eprubetele din rîndul 3) (martor) la numărul de leziuni apărute pe membranele corioalantoide a ouălor inoculate cu amestecul virus-ser de cercetat (eprubetele rîndului 1 şi 2).

Rezultatele obţinute prin această tehnică i-a determinat pe Burnet şi Lush (36) să considere că nivelul anticorpilor din serul uman are un caracter de „tot sau nimic", ei fiind sau într-un titru înalt şi deci capabili de a neutraliza complet virusul, sau absenţi.

Jawetz şi Coleman (80), cercetînd prezenţa anticorpilor neutralizanţi în serurile recoltate de la indivizii umani cu leziuni cutanate, mucoase sau corneene de herpes recidivant, demonstrează că anticorpii la om nu au caracter de „tot sau nimic", titrurile lor fiind în limite destul de largi.

Rezultatele obţinute de Burnet şi Lush s-ar datora, după diverşi autori, tehnicii de lucru folosite.

După Jawetz şi Coleman, menţinerea amestecului virus + ser timp de o oră la 37°C este suficientă în testarea corectă a anticorpilor seroneutralizanţi.

Tehnica de neutralizare pe membrana corioalantoidă a fost utilizată de numeroşi alţi autori în diagnosticul infecţiei herpetice (153) (48) (30) (125) (74) (126) (4) (131) (33) (69) (77) (148) (70).

În general, pentru studiul cantitativ al anticorpilor neutralizanţi în serul indivizilor, se foloseşte tehnica amestecului diluţiilor de ser-doză constantă de virus. Serul uman diluat (diluţii binare pînă la 1/256) şi serul normal de iepure (diluţie 1/16) amestecate în părţi egale cu o doză constantă de virus sînt inoculate după o oră de menţinere la 37°C pe membrana corioalantoidă a ouălor de găină embrionate în vîrstă de 12 — 13 zile. Ouăle inoculate, după 48 de ore de menţinere la 36°C, sînt sacrificate; se face numărătoarea coloniilor, iar titrul anticorpilor serici este reprezentat de diluţia cea mai mare de ser care este capabilă de a reduce cu 50% numărul de colonii, faţă de martor.

Scanned with OKEN Scanner

Inocularea amestecului ser-virus intravitelin. Jawetz şi Coleman (80), Jawetz, Allende şi Coleman (79), Geller, Coleman şi Jawetz (62), şi Jawetz, Coleman şi Merril (82) folosesc în diagnosticul infecţiei herpetice reacţia de seroneutralizare intravitelină.

Fie că se foloseşte tehnica ser constant-diluţii de virus (ser inactivat 20 min la 56°, diluat 1/30 sau 1/50, este amestecat în părţi egale cu diluţii de virus 10^{-1}—10^{-5}), fie tehnica diluţii de ser-doză constantă de virus (diluţii binare de ser amestecate în părţi egale cu 3—30 LD_{50} de virus), după menţinerea amestecului timp de o oră la 37°C se inoculează ouă în vîrstă de 7 zile pe cale intravitelină cu cîte 0,5 ml din fiecare diluţie.

În prima tehnică de lucru se notează mortalitatea embrionilor apăruţi după 3— 12 zile de la inoculare, iar rezultatul seroneutralizării este redat de calculul LD_{50}; în cea de-a doua tehnică rezultatul este reprezentat de diluţia de ser care determină o protecţie 50%.

Yoshino şi colab. (186) aduc însă o nouă tehnică, mult mai simplă, de titrare a virusului herpetic *simplex* prin inocularea intravitelină a ouălor de găină în vîrstă de o zi şi dovedesc că titrul virusului astfel cultivat este aproape egal cu acela al virusului inoculat pe aceeaşi cale la ouăle embrionate de vîrstă mai mare. Titrarea virusului în sacul vitelin al ouălor de o zi dă rezultate însă mult mai rapide (într-o săptămînă, în comparaţie cu inoculările pe ouăle embrionate în vîrstă de 7 zile), deviaţia standard a titrurilor, folosind 10 ouă/diluţie, fiind de 0,3—0,4 log 10.

Comoditatea de lucru, menţinerea unui titru constant al virusului şi rapiditatea obţinerii unui rezultat au făcut ca această tehnică să fie recomandată de autori în testele de neutralizare ale virusului herpetic. După o incubare de o oră la 37°, amestecul virus-ser (cantităţi constante de virus cu diluţii variabile de ser) este inoculat pe ouă (cîte 5 ouă pentru fiecare diluţie de ser.

3. SERONEUTRALIZAREA ÎN CULTURI CELULARE

Seroneutralizarea în culturi celulare este mult mai avantajoasă decît cea pe animale sau în oul de găină embrionat.

Seroneutralizările efectuate în paralel în culturi celulare şi intracerebral la şoarece duc la rezultate identice, însă un rezultat mult mai rapid este obţinut în culturile celulare (3—5 zile de la inoculare) decît pe şoarece (8 — 16 zile de la inoculare).

Seroneutralizarea în culturi tisulare a fost aplicată de numeroşi autori (80) (82) (132) (163) (144) (184) etc. în diagnosticul serologic al infecţiei herpetice.

Uşurinţa de lucru pe celule HeLa a făcut ca acest suport celular să fie utilizat în multe laboratoare de specialitate.

Scanned with OKEN Scanner

Cîte 0,1 ml din amestecul în părţi egale a unei doze constante de virus (200 DIC_{50}) cu diluţii seriate (1/2, 1/4 etc.) de ser inactivat 30 min la 56°C, se inoculează pe celule, după prealabila menţinere a amestecului timp de o oră la 37°C. Datorită labilităţii virusului se impune ca diluţiile (virus şi ser) să fie făcute cu ser de iepure normal diluat 1/100 în lichidul de cultură.

După 2—5 zile de la inoculare şi menţinere a tuburilor la 37°C, se citeşte rezultatul reacţiei. Titrul neutralizant al serului este reprezentat de diluţia limită care împiedică apariţia efectului citopatic.

Schneweis (144) foloseşte în reacţia de neutralizare 3 metode de lucru. Pentru a avea o concentraţie de virus bine determinată şi stabilă, autorul utilizează celulele HeLa pe care le inoculează cu virus herpetic. Cultivarea o face într-un mediu care conţine o mică cantitate de ser de viţel; după apariţia efectului citopatic clarifică produsul de cultură prin centrifugare, iar supernatantul obţinut îl amestecă în părţi egale cu lapte degresat, sterilizat în prealabil, şi-l conservă în fiole la —70°C.

În prima metodă, Schneweis utilizează o doză constantă de virus (200 unităţi formatoare de plaje în 0,25 ml) pe care o amestecă în părţi egale cu diluţiile descrescînde de ser. După menţinere timp de o oră la 37°C, se inoculează pe celule HeLa bine dezvoltate cîte 0,25 ml din amestecul virus-ser (cîte 5 tuburi pentru fiecare diluţie de ser). Tuburile sînt menţinute apoi 3 ore la 36°C pentru adsorbţia virusului, iar după aceea se adaugă la fiecare tub cîte 1,5 ml mediu de menţinere; citirea reacţiei se face în momentul cînd în tuburile martore inoculate cu virus (200 unităţi formatoare de plaje suspendate în cantităţi egale de SST) apare un efect citopatic net.

Puterea neutralizantă a fiecărei diluţii de ser se evaluează prin procentajul reducerii numărului de plaje în raport cu martorul. Titrul serului este stabilit la diluţia care arată o reducere cu 90% a numărului de plaje.

În cea de-a doua metodă, autorul amestecă în părţi egale diluţii descrescînde de ser cu 10^5 unităţi formatoare de plaje de virus.

După menţinerea timp de 2 ore la 30°C se ia cîte 0,1 ml din fiecare diluţie de ser + virus şi se suspendă în 0,9 ml mediu de menţinere, în prealabil răcit.

Cîte 0,25 ml din fiecare această diluţie se inoculează pe celule HeLa care apoi sînt incubate la 36°C; citirea rezultatului se face în momentul cînd tuburile martore (0,1 ml din suspensia virală + parte egală de SST, diluat în 0,9 ml SST) prezintă efecte citopatice evidente. Puterea neutralizantă a serului corespunde diluţiei care neutralizează 10^2 unităţi formatoare de plaje.

În cea de-a treia metodă, autorul amestecă în părţi egale o diluţie fixă de ser cu 10^5 unităţi formatoare de plaje de virus. Din acest amestec ia apoi 0,1 ml la care adaugă 0,9 ml mediu de menţinere. Această diluţie este menţinută în baia Marie la 30°C. Din 15 min în 15 min se prelevează cîte 0,1 ml care se diluează ca mai sus şi se inoculează în culturi

de celule HeLa (0,25 ml). Citirea reacţiei se face ca şi în metodele de mai sus; metoda are însă avantajul că furnizează date în special asupra cineticii reacţiei de neutralizare şi nu asupra puterii de neutralizare a serului.

Becker (19) foloseşte în reacţie culturile celulare de rinichi de *Cercopithecus aethiops pygerythrus*, preparate după tehnica sa (20).

200 DIC_{50} conţinute în 0,1 ml sînt amestecate cu aceeaşi cantitate din diluţiile de ser; amestecul este menţinut la 4°C timp de 1—4 ore şi apoi inoculate pe culturi celulare.

Citirea rezultatului reacţiei se face după 3—6 zile de menţinere a tuburilor la 37°C, adică în momentul cînd martorii de virus dau un efect citopatic complet.

Diluţia limită de ser care dă o neutralizare semnificativă reprezintă titrul său neutralizant.

Espmark (52) foloseşte în seroneutralizare celulele renale de iepure şi celulele HeLa. După 7 zile de la inocularea amestecului virus + ser (200 DIC_{50} + diluţii seriate de ser) calculează titrul neutralizant al serului după metoda Kärber (87).

4. SERONEUTRALIZAREA PE LAMELE DE AGAR

Capacitatea de neutralizare a virusului se apreciază după efectul citopatic (146) (91) (156) şi după inhibiţia metabolică (142).

Recent, Umeda şi colab. (167) pun la punct o tehnică de neutralizare pe lamele de agar.

Celulele embrionare de găină se obţin prin tripsinizarea embrionilor. După o pretripsinizare (tripsină 0,2%) timp de 10 min la 37°C se mai fac 4 tripsinizări succesive.

După o centrifugare uşoară (800 t/min timp de 5 min) celulele sînt spălate în mediul de creştere (4 părţi soluţie Earle cu 0,5% lactalbumină şi 0,1% extract de drojdie de bere, o parte ser de viţel inactivat, 200 unităţi penicilină/ml, 200 μg streptomicină/ml şi 20 unităţi micostatin/ml) şi apoi resuspendate în acelaşi mediu, pentru a obţine 2 000 000 celule/ml.

Din suspensia de celule se pun apoi cîte 10 ml/90 mm cutie Petri; cutiile Petri sînt apoi menţinute la 37°C timp de 2 zile sub atmosferă de CO_2 umidificat. Înainte de a inocula virusul, pînza de celule este spălată o singură dată în tampon fosfat.

Se prepară apoi o soluţie 2% de agar (Difco) încălzit la 45°C, care se amestecă în părţi egale cu mediul de menţinere dublu concentrat ce conţine 10% ser de viţel, fără roşu fenol; se toarnă apoi acest amestec într-un vas de

metal cu fundul plat, în aşa fel încît să se formeze o pînză de agar groasă de 1,2 mm. Se lasă să se solidifice şi după aceea se fac discuri de 14 mm diametru (lamele de agar).

După menţinerea amestecului ser-virus (diluţii binare de ser în tampon fosfat 0,01 M + doză constantă de virus) timp de o oră la 37°C se introduce în fiecare tub de diluţie o ansă de platină astfel calibrată încît să cuprindă 0,002 ml lichid. Cantitatea de amestec ser-virus luată cu această ansă se întinde pe suprafaţa lamelei (discului) de agar.

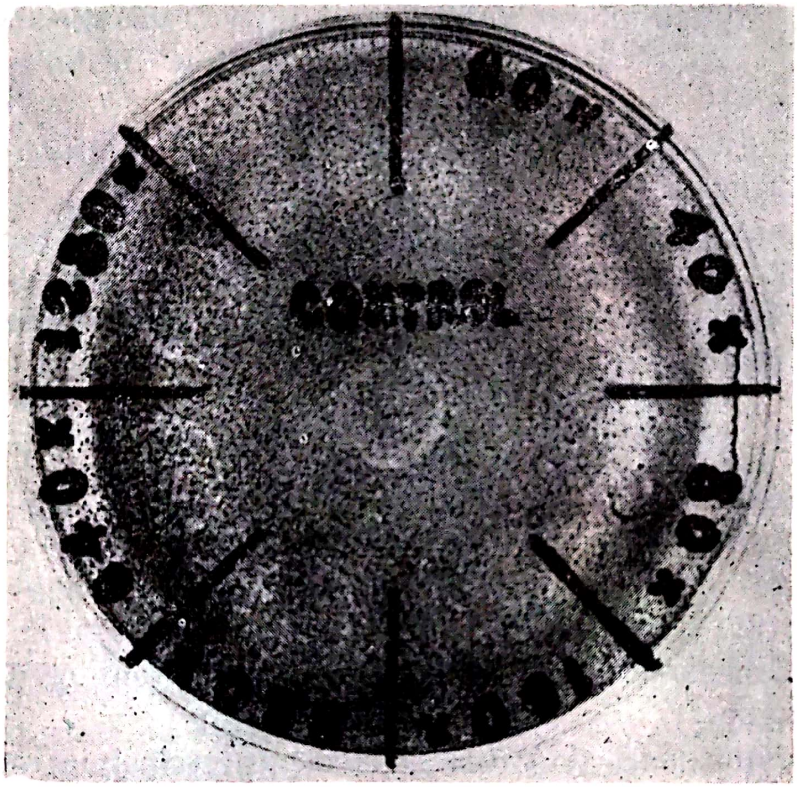


Fig. 121. — Aspectul testului de neutralizare pe lamele de agar. Umeda, Taniguchi, Arai şi Yoshino, 1963.

Lamelele se pun apoi cu faţa în jos, pe suprafaţa pînzei de celule crescute în cutia Petri şi totul se acoperă cu soluţia de agar, preparată ca mai sus (7 ml pentru fiecare cutie Petri). Se lasă apoi cutia Petri la temperatura camerei pînă se solidifică agarul şi apoi se introduce la termostat sub atmosferă de CO_2. După 2 zile de incubare se adaugă încă 4 ml din soluţia 1% agar cu 1/10 000 roşu neutru, iar citirea se face după alte 24 de ore.

Tehnica are avantajul că necesită cantităţi mici de materiale (celulele obţinute prin tripsinizarea unui embrion de găină sînt suficiente pentru studiul anticorpilor a 3—5 seruri) şi este tot atît de sensibilă ca şi celelalte tehnici de neutralizare, iar rezultatul obţinut este foarte concludent (fig. 121) şi rapid.

Scanned with OKEN Scanner

5. TESTUL COLORIMETRIC DE NEUTRALIZARE A VIRUSULUI SCHMIDT ȘI LENNETTE (142)

Acest test se execută în culturi celulare și se bazează pe reacția de inhibiție metabolică (colorimetrică).

Superioritatea testului constă în aceea că el este mult mai ușor de condus decît testul de neutralizare pe șoarece sau ou de găină embrionat, iar rezultatul obținut este cel mai satisfăcător.

După tripsinizarea embrionilor de găină celulele obținute se spală în soluție Hanks, iar sedimentul obținut după o centrifugare timp de 10 min la 500 t/min este diluat 1/250 în mediul nutritiv compus din:

ser de miel (inactivat 30 min la 56°) 5 ml
soluție glucoză 20% 1,5 ml
amestec 199 în soluție Earle de bază tamponată cu 2,5 ml din 8,8% $NaHCO_3$/100 ml . . . ad 100 ml
penicilină 250 unități
streptomicină 250 μg
neomicină 250 unități
bacitracină 2,5 unități.

Autorii utilizează acest mediu la diluțiile de ser și antigen. La fiecare diluție de ser (1/4 — 1/2048) se adaugă un volum egal din diluția constantă de virus (0,25 ml ser + 0,25 ml din diluția de virus ce conține aproximativ 200 DIC_{50}). După menținerea amestecului (ser-virus) timp de 30—60 min la 4°C, se adaugă în fiecare tub cîte 0,25 ml din diluția 1/250 de celule.

În reacție este recomandat a se face martori ai toxicității serului pentru celule (0,25 ml din primele 4 diluții de ser se amestecă cu 0,25 ml de mediu metabolic în loc de virus, după care se adaugă 0,25 ml din diluția 1/250 de celulă) și martor de virus (0,25 ml din diluția de virus se amestecă cu 0,25 ml mediu și cu 0,25 ml suspensie de celule). Fiecare test va conține în plus 16 tuburi de control al metabolismului celular.

— 4 tuburi, fiecare cu cîte 0,5 ml mediu metabolic și 0,25 ml din dil. 1/125 de celule
— 4 tuburi, fiecare cu 0,5 ml mediu metabolic și 0,25 ml din dil. 1/250 de celule
— 4 tuburi, fiecare cu cîte 0,5 ml mediu metabolic și 0,25 ml din dil. 1/500 de celule
— 4 tuburi, fiecare cu cîte 0,5 ml mediu metabolic și 0,25 ml din dil. 1/1000 de celule.

Tuburile-test se mențin tot la temperatura de 36°C, după ce ele sînt închise etanș cu 0,5 ml olei mineral steril (vîscozitate 350).

Scanned with OKEN Scanner

După 8 zile de menţinere la 36°C, tuburile în care diluţia de celule este de 1/125 şi 1/250 trebuie să aibă pH 6,8 şi 7, iar cele în care diluţia de celule este de 1/500 şi 1/1000, un pH de 7,8 şi 8.

pH-ul 7,3 sau mai mare indică multiplicarea virusului, iar pH-ul de 7,2 sau mai mic, o neutralizare specifică a dozei de virus folosită.

C. REACŢIA DE FIXARE A COMPLEMENTULUI

1. DATE GENERALE

Alături de reacţia de neutralizare, destul de costisitoare, reacţia de fixare a complementului (RFC), prin sensibilitatea sa, este de asemenea folosită în diagnosticul infecţiei herpetice. Ea a fost utilizată de numeroşi autori, fiecare din ei aducînd îmbunătăţiri atît la obţinerea unui bun antigen şi la executarea reacţiei.

În 1925, Todorovici (164), folosind ca antigen fixator de complement lichidul recoltat din leziunile veziculare herpetice, obţine cu serurile maimuţelor imunizate cu virus herpetic rezultate pozitive.

Greenbaum şi Harkins (67) prepară din creierul de iepure infectat cu virus herpetic un antigen fenolat pe care îl utilizează în RFC. Decelarea prezenţei anticorpilor fixatori de complement în serurile iepurilor imunizaţi faţă de virusul herpetic a determinat pe autori să considere reacţia ca fiind specifică în infecţia herpetică.

Kraus şi Takaki (93) (94) au adus de asemenea date asupra specificităţii acestei reacţii; cu ajutorul unui coctoantigen preparat din creierul de iepure infectat, autorii au putut diferenţia infecţia herpetică de cea vaccinală sau rabică la iepure. Aplicînd aceeaşi metodă de lucru, Takaki, Borris şi Koref (160) demonstrează diferenţa dintre virusul izolat de Levaditi din creierul unei persoane moarte de encefalită von Economo şi virusul encefalitei japoneze B, şi identitatea lui cu virusul herpetic izolat de Doerr şi de Luger şi Lauda (101).

Folosind RFC în punerea în evidenţă a anticorpilor herpetici în serul hiperimun de cobai, Bedson şi Crawford (23) obţin în mod constant rezultate negative, deşi acelaşi ser prezenta capacitatea de a neutraliza virusul.

Datele obţinute de Schultz şi Hoyt (146) nu au putut însă confirma pe acelea ale lui Kraus şi Takaki şi Takaki, Borris şi Koref. Schultz şi colaboratorii săi (145) (146) (147) au considerat că rezultatele pozitive obţinute în RFC nu ar fi specifice, ci determinate de germenii bacterieni din aceste antigene.

Gildemeister şi Heuer (64), utilizînd tehnica lui Takaki, Borris şi Koref (160) obţin tot rezultate negative în RFC.

Rezultate contradictorii au fost obţinute ulterior şi de alţi autori. Astfel, în timp ce Stroian (158) demonstrează prezenţa anticorpilor fixa-

Scanned with OKEN Scanner

tori de complement în serul imun de iepure, folosind ca antigen extractul de țesut nervos de iepure infectat cu virusul herpetic, alți autori ca Gay și Holden (61) și Tang și Castaneda (162) obțin, cu un antigen preparat din creierul glicerinat de iepure, rezultate negative.

Bedson și Bland (22) arată însă că specificitatea RFC depinde de antigenul folosit. Cu un antigen preparat din leziunile plantare ale cobaiului inoculat intradermic cu o tulpină de virus adaptată la această specie animală, autorii demonstrează că RFC este specifică, ea nefiind influențată de germenii bacterieni, așa după cum considerau Schultz și col.

Tehnica lui Bedson și Bland a fost aplicată și de Brain (29) în studiul anticorpilor în serul uman. Autorul consideră că RFC, deși mai puțin sensibilă decît seroneutralizarea, poate fi totuși folosită în diagnosticul infecției herpetice, datorită rapidității obținerii rezultatelor.

Myers și Chapman (113) folosesc în RFC antigene obținute din membrana corioalantoidă și lichidele embrionare recoltate de la ouăle infectate cu virus herpetic. Rezultatele obținute de autori nu au fost însă destul de satisfăcătoare, datorită diferențelor mici existente între titrul serurilor animalelor imune și al animalelor normale.

Hayward (73), utilizînd antigene preparate tot din membranele corioalantoide și lichidele amniotic și alantoidian recoltate de la ouăle infectate cu virus herpetic, demonstrează că serurile umane conțin anticorpi cu titru pînă la 1/128 ; după Hayward rezultatele RFC concordă întru totul cu cele obținute prin seroneutralizare.

Dudgeon (48) folosește metoda lui Hayward de preparare a antigenului, însă cu îngheț-dezgheț repetat, și obține cu serurile bolnavilor de herpes rezultate pozitive în RFC, titrurile anticorpilor fiind mai joase decît cele obținute de Hayward.

Cercetînd seruri recoltate de la copii cu stomatită acută și erupție variceliformă Kaposi, autorul constată în cursul evoluției bolii o creștere a titrului anticorpilor herpetici, fapt ce-l determină să recomande această reacție în diagnosticul serologic al bolii herpetice. Sohier și colab. (155) folosesc în diagnosticul infecției herpetice un antigen preparat după metoda lui Dudgeon, cu rezultate inconstante.

Rezultate pozitive obține și Fowler (59) la cobaii imunizați, utilizînd ca antigen suspensia de membrană corioalantoidă și lichidul alantoidian de la ouăle de găină infectate cu virusul herpetic.

Afzelius-Alm (4) experimentează însă în cercetările sale serologice, în afară de antigenul preparat din membrana corioalantoidă, și un antigen din creierul de șoarece infectat experimental și ajunge la concluzia că în diagnosticul serologic al bolii herpetice e de preferat reacția de seroneutralizare, titrurile anticorpilor fixatori de complement fiind foarte mici.

Gajdusek, Robbins și Robbins (60) constată că antigenele preparate pe oul de găină embrionat, cu diverse tulpini de virus herpetic, au capacitatea fixatoare de complement diferită. Folosind tehnica lui Enders și Levens (51)

Scanned with OKEN Scanner

de fixare a complementului, autorii de mai sus confirmă paralelismul dintre rezultatele obţinute în reacţiile de fixare a complementului şi seroneutralizare, ambele efectuate cu seruri recoltate de la indivizi cu gingivo-stomatită şi eczemă herpetică.

După Scott şi colab. (150) antigenul preparat după metoda lui Dudgeon are o bună activitate fixatoare de complement numai în momentul în care virusul a ajuns la o concentraţie de 10^7 unităţi infectante pe membrană.

Sohier şi colab. (155) consideră că pentru obţinerea unui bun antigen este necesară folosirea unei tulpini de virus herpetic adaptate la ou, care să posede un titru infectant foarte ridicat; inoculat în diluţia de 10^{-5}, virusul trebuie să determine leziuni confluente pe membrana corioalantoidă şi moartea a cel puţin 50% din embrionii ouălor infectate intravitelin.

Datele obţinute de Halonen (71) în ceea ce priveşte RFC şi aplicarea sa la studiul anticorpilor herpetici au dus la concluzia că tulpinile de virus folosite la prepararea de antigene variază din punctul de vedere al capacităţii lor ficxatoare de complement; cu tulpini alese convenabil, se pot obţine antigene din lichidele amnio-alantoidiene şi din membranele corioalantoide ale ouălor de găină embrionate, primele fiind însă mult superioare, datorită lipsei proprietăţilor lor anticomplementare.

După Modi şi Tobin (108) antigenele herpetice obţinute din lichidele amniotic şi alantoidian, din membrana corioalantoidă şi din leziunile plantare de cobai sînt cele mai satisfăcătoare în desfăşurarea reacţiei de fixare a complementului.

Odată cu punerea la punct a metodelor de preparare a antigenelor, RFC a fost utilizată de numeroşi autori în diagnosticul bolii herpetice sau în studiul incidenţei anticorpilor herpetici (30) (28) (13) (150) (1) (77) etc.

Din datele autorilor reiese că un rezultat corect se obţine cînd se foloseşte în reacţie un antigen specific şi cu titru înalt.

2. OBŢINEREA DE ANTIGENE

Pentru buna desfăşurare a RFC este necesară folosirea unui antigen cu un titru ridicat. Pentru obţinerea unui astfel de antigen se folosesc diverse metode de lucru.

Trebuie însă ţinut seama de faptul semnalat de Halonen (71) că nu toate tulpinile de virus herpetic au aceeaşi putere antigenică în RFC.

a. *Antigene preparate din leziunile plantare ale cobaiului.* Bedson şi Bland (22) au arătat că extractul preparat din leziunile plantare ale cobaiului infectat cu herpes este un bun antigen pentru detectarea anticorpilor fixatori de complement în serul cobailor imunizaţi antiherpetic.

Supernatantul obţinut după centrifugarea timp de cîteva minute la 500—1 000 t/min a emulsiei plantare diluate 10% în tampon fosfat M/50 cu pH 7,6 dă rezultate superioare în ceea ce priveşte decelarea anticorpilor

Scanned with OKEN Scanner

în serul cobailor imunizaţi intraperitoneal cu 6—8 doze a cîte 1—2 ml din suspensia 10% de virus herpetic, cu condiţia ca el să fie folosit proaspăt şi în diluţie de 5 sau 10%.

Brain (29), folosind această metodă de preparare a antigenului, obţine aceleaşi rezultate în RFC. Autorul utilizează în reacţie seruri recoltate de la 52 de indivizi sănătoşi şi de la 48 de foşti bolnavi de herpes şi găseşte titruri pozitive în proporţie de 45% în primul lot cercetat şi de 100% în cel de-al doilea lot.

Tehnica de preparare fiind prea costisitoare prin utilizarea ca sursă de antigen a leziunilor plantare de cobai, numeroşi autori şi-au îndreptat atenţia asupra folosirii oului de găină embrionat în prepararea antigenelor de fixare a complementului.

b. *Antigene preparate din membrana corioalantoidă.* Virusul cultivă cu uşurinţă în oul de găină embrionat, indiferent de calea de inoculare (membrană corioalantoidă, sac vitelin, amnios).

Cultivarea virusului herpetic pe membrana corioalantoidă a fost iniţial dovedită de către Dawson (46), iar ulterior Burnet şi Lush (37) aplică această metodă la studiul mai multor virusuri, între care şi virusul herpetic.

Faptul că tulpinile de virus herpetic adaptate pe ou produc o infecţie generalizată a embrionului de găină (6) şi că inocularea intravitelină sau intraamniotică a acestor tulpini este urmată la cîteva zile de o concentraţie mare de virus în lichidul amniotic (115) (24) l-au determinat pe Hayward (73) să studieze proprietăţile fixatoare de complement ale extractelor de membrană corioalantoidă şi ale lichidelor amniotic şi alantoidian recoltate de la ouăle infectate cu virus herpetic *simplex*.

La 48 de ore de la inocularea ouălor cu virus herpetic după tehnica lui Beveridge şi Burnet, autorul recoltează membranele corioalantoide pe care, după mojarare, le suspendă în soluţie fiziologică ce conţine 20% bulion nutritiv (0,5 ml din această soluţie pentru fiecare membrană). După agitare timp de 2 ore la temperatura camerei, suspensia este centrifugată timp de 5—10 min la 500—1 000 t/min, iar supernatantul rezultat reprezintă antigenul.

Holzel şi colab. (77), folosind aceeaşi metodă de preparare a antigenului, cu singura deosebire că suspensia se centrifughează 10 min la 2 500 t/min şi apoi 20 min la 6 000 t/min, obţin rezultate bune în RFC.

S-a constatat de către Hayward că acest antigen (lichidul supernatant) îşi păstrează puterea sa fixatoare de complement după o centrifugare de o oră la 8 000 t/min, cu toate că în supernatant a rămas după această centrifugare, mai puţin de 2% din virusul existent în suspensia de la care s-a pornit. Acelaşi supernatant îşi menţine proprietatea fixatoare de complement prin încălzire la 56° timp de o oră, însă şi-o pierde prin încălzire la 100° timp de 5 min. Acest fapt l-a determinat pe autor să considere că puterea fixatoare de complement se datoreşte nu particulelor virotice, ci unei substanţe specifice „solubile", separabilă prin centrifugare.

Scanned with OKEN Scanner

Brown (31) izbuteşte, prin centrifugarea (3 ore la 9 000 t/min) a suspensiei de membrană corioalantoidă în soluţie fiziologică salină, să separe antigenul viral (corpuscular) de la cel solubil şi să demonstreze că singurul antigen care intervine în reacţia de fixare a complementului este cel solubil.

După autor este greu de a preciza dacă această componentă antigenică corespunde unui ,,precursor'' al virusului sau este un produs de dezintegrare al acestuia. Cert este însă faptul că numai după administrarea acestui antigen apar la animal anticorpii seroneutralizanţi.

Dudgeon (48) pune la punct o altă metodă de preparare a antigenului fixator de complement.

Ouăle în vîrstă de 11 zile, inoculate cu o cantitate de virus de aproximativ 10^{-3}, sînt sacrificate după 48 de ore de menţinere la 36°C; din membranele corioalantoide bine mojarate se face o suspensie 20% în tampon Mayer diluat 1/5 în apă bidistilată. După 6 îngheţuri şi dezgheţuri, supernatantul rezultat după centrifugarea timp de o oră la 2 500 t/min poate fi folosit ca antigen.

S-a încercat de către Wildy şi Holden (179) prepararea unui antigen fixator de complement din membranele corioalantoide congelate; mojaratul rezultat, fără adaosul vreunui diluent, supus unei centrifugări de 5 min la 3 000 t/min, urmată de o a doua centrifugare timp de 20 min la 2 400 g, reprezintă antigenul fixator de complement.

Pentru obţinerea antigenului din membrana corioalantoidă, Artzet (11) infectează ouăle pe această cale cu 0,5 ml din diluţia de 10^{-4} (echivalent cu 10 DI_{50}) de virus conservat la —70° (datorită labilităţii virusului, suspensia virotică se prepară în soluţie fiziologică la care se adaugă 10% ser de iepure inactivat). După inoculare, ouăle se menţin la 35°C şi se rotează de mai multe ori pe zi, pînă în momentul sacrificării lor (5 zile de la inoculare).

La prepararea antigenului din membrana corioalantoidă Artzet utilizează metoda recomandată de Dudgeon. Suspensia 20% în tampon veronal (105) este supusă la 6 îngheţuri (—40°) şi dezgheţuri (+ 37°C) cu scopul de a elibera antigenul din celulă şi de a precipita lipoproteinele străine care au acţiune anticomplementară. Supernatantul obţinut după centrifugarea suspensiei la 4 500 t/min timp de o oră reprezintă antigenul fixator de complement.

Indiferent de metoda folosită, s-a constatat însă că antigenele obţinute din membrana corioalantoidă nu au titruri mai mari de 1/16.

c. *Antigene preparate din lichidele extraembrionare.* Lichidele extraembrionare au fost preferate de numeroşi autori ca antigene de fixare a complementului, în locul celor obţinute din membrana corioalantoidă.

Astfel, Hayward (73) foloseşte ca antigene lichidele amniotic şi alantoidian recoltate de la ouăle moarte în urma inoculării intraviteline, sau în cavitatea amniotică sau alantoidiană.

Scanned with OKEN Scanner

Datele obţinute l-au determinat pe autor să considere că antigenele preparate din lichidele amniotic şi alantoidian sînt mai bune decît cele obţinute din membranele corioalantoide, datorită lipsei aproape complete a anticomplementarităţii lor. Ca şi la antigenul preparat din membrana corioalantoidă, puterea fixatoare de complement a acestor antigene (amniotic sau alantoidian) se datoreşte după autor unei componente solubile şi nicidecum particulei virotice.

Gajdusek, Robbins şi Robbins (60) studiază capacitatea fixatoare de complement a lichidelor amniotic şi alantoidian prelevate de la ouăle în vîrstă de 8—9 zile, inoculate intravitelin (diluţia de virus folosită trebuie să permită supravieţuirea ouălor timp de 4—6 zile). Lichidele recoltate în momentul cînd mortalitatea embrionilor este de 25—30% sînt folosite ca antigene fie ca atare, fie după ce în prealabil ele au fost supuse unei dialize timp de 18—24 de ore contra unei soluţii de tampon fosfatat M/100, pentru îndepărtarea uraţilor.

Wildy şi Holden (179) folosesc, de asemenea cu bune rezultate, lichidele amniotic şi alantoidian recoltate între 48 şi 96 de ore de la inocularea ouălor şi ajung la concluzia că antigenul obţinut din lichidul amniotic are un titru mai ridicat.

Folosind lichidele amniotic şi alantoidian recoltate la 60 de ore de la infectarea ouălor cu o tulpină de virus diluat $10^{-2,5}$, Dascomb şi colab. (45) obţin rezultate în fixarea complementului. Lichidele menţinute în prealabil 1 oră la 37°C, centrifugate apoi 15 min la 1 500 t/min şi supuse razelor ultraviolete, reprezintă un bun antigen fixator de complement.

Sohier şi colab. (155) constată că lichidele amniotic şi alantoidian obţinute de la ouăle infectate concomitent cu 0,1 ml intraamniotic şi 0,2 ml intravitelin (diluţia de virus 10^{-3}) dau cele mai bune rezultate în RFC.

Pentru obţinerea acestor antigene Artzet (12) foloseşte ouă pe care le inoculează intravitelin sau intraamniotic cu cîte 0,25 ml din suspensia 10^{-3} de membrană corioalantoidă sau din amestecul de lichide amniotice sau alantoidiene nediluate.

Ouăle inoculate se menţin la 37°C timp de 3 — 5 zile, iar lichidele amniotic şi alantoidian se recoltează după sacrificare şi se utilizează în reacţia de fixare a complementului, după o prealabilă centrifugare a lor.

Folosind aceleaşi antigene, Fowler (59) şi Sohier şi colab. (155) decelează prezenţa anticorpilor fixatori de complement la bolnavii cu infecţie herpetică.

d. *Antigene preparate din amestecul de membrană corioalantoidă şi sac amniotic* (148) (156). Ouă în vîrstă de 8—9 zile sînt inoculate intravitelin cu $\pm$ 50 LD_{50} de virus. La 50—60 de ore de la inoculare se recoltează şi se amestecă membranele corioalantoide şi sacii amniotici, după ce în prealabil ouăle au fost menţinute cîteva zile la 4°C. Suspensia 25% în tampon cu pH 7,2 este apoi centrifugată 20 min la 2 000 t/min, iar supernatantul obţinut reprezintă antigenul fixator de complement.

Scanned with OKEN Scanner

Este recomandabil ca mai înainte de a fi utilizat în RFC produsul să fie din nou centrifugat 20 min la 2 000 t/min.

e. *Antigene preparate din sacul vitelin.* Artzet (12) utilizează metoda lui Volkert şi Christensen (169) de preparare a antigenului fixator de complement pentru virusurile din grupa psittacozei, prin extracţie cu acetonă şi eter, cu care însă nu obţine rezultate satisfăcătoare în RFC.

Antigene preparate din embrionul de găină. Plecînd de la faptul constatat de Anderson (6) că inocularea virusului herpetic în oul de găină embrionat este urmată de o generalizare a infecţiei cu moartea embrionilor, Artzet (12) utilizează în prepararea antigenului fixator de complement embrionii recoltaţi de la ouăle moarte în urma inoculării virusului pe membrana corioalantoidă.

Suspensia de embrioni (20%) în tampon veronal este centrifugată timp de 45 min la 5 000 t/min (suspensia este în prealabil supusă la 5 îngheţuri şi dezgheţuri), iar supernatantul rezultat reprezintă antigenul fixator de complement. Cercetările autorului au demonstrat că acest antigen are însă o valoare mediocră în depistarea anticorpilor specifici.

g. *Antigene din creier de şoarece. Antigen Casals şi Palacios* (40). Se prepară o emulsie de creier de şoarece infectat cu herpes şi se suspendă în soluţie fiziologică cu 2% ser normal de cobai, inactivat 30 min la 56°C. Suspensia menţinută peste noapte la +4° este apoi centrifugată la 2 500 t/min timp de 30 min, iar supernatantul este supus la 5 îngheţuri şi dezgheţuri, după care este recentrifugat la 4 500 t/min timp de 30 min; lichidul supernatant obţinut este folosit ca antigen.

Antigen Casals (39). La un volum de creier de şoarece infectat, bine emulsionat, se adaugă 20 de volume de acetonă. După 2 min de menţinere la rece, produsul este centrifugat la 1 500 t/min timp de 1 min, iar depozitul resuspendat în aceeaşi cantitate de acetonă; produsul se agită 20 min, după care se centrifughează uşor, iar depozitul rezultat este suspendat în 20 de volume din amestecul în părţi egale de acetonă-eter. După agitare timp de 20 min la temperatura camerei, produsul este centrifugat, iar depozitul suspendat în acelaşi volum de eter. Se repetă centrifugarea după alte 20 min de menţinere şi agitare la temperatura camerei. Urmează alte două extracţii cu eter; depozitul rezultat de la ultima extracţie cu eter este uscat, iar pudra rezultată se dizolvă în soluţie fiziologică (1 volum creier iniţial + 3 volume soluţie fiziologică); suspensia se menţine peste noapte la +4°, după care se centrifughează o oră la 10 000 t/min, iar supernatantul rezultat este folosit ca antigen.

Folosind aceeaşi metodă de extracţie, Artzet (12) obţine, din creierul de iepure infectat cu tulpinile Bruxelles şi 54 — 33 de virus herpetic, antigene care s-au dovedit a fi însă de calitate mediocră în RFC.

Scanned with OKEN Scanner

h. *Antigene preparate pe culturi celulare.* Odată cu utilizarea în virusologie a culturilor celulare, evident că s-a încercat folosirea lichidelor de cultură ca antigene fixatoare de complement, însă aceste antigene sînt deseori anticomplementare şi au titruri foarte scăzute.

Balducci, Tyrell şi Stuart-Harris (14) folosesc cu rezultate relativ bune antigenul preparat pe celule renale de iepure (lichid de cultură recoltat la 6—8 zile de la inocularea virusului). Ei izbutesc să separe componenta corpusculară (sedimentabilă) de cea solubilă (nesedimentabilă) şi demonstrează că serurile umane reacţionează în RFC numai faţă de componenta sedimentabilă.

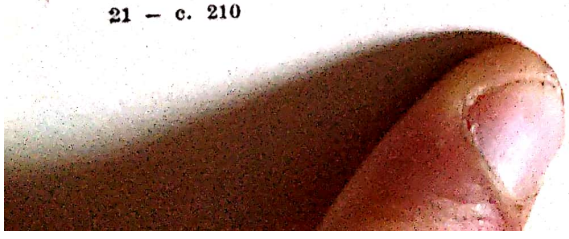
Schmidt, Lennette şi Shon (143) cercetează condiţiile de a obţine un bun antigen fixator de complement pe celule de embrion de găină; obţin celulele embrionare de găină prin tripsinizarea embrionilor (200 ml de tripsină 25% pentru 5—10 embrioni) prin agitare magnetică la temperatura camerei. Lichidul supernatant, rezultat prin simpla depunere a fragmentelor de embrion, este apoi centrifugat timp de 10 min la 500 t/min. Depozitul rezultat este readus la acelaşi volum în soluţie Hanks de bază tamponată. După suspendarea celulelor, se face o nouă centrifugare, iar depozitului obţinut i se adaugă 15—30 ml de soluţie Hanks tamponată. Depozitul de celule rezultat după o centrifugare uşoară este suspendat 1/100 într-un mediu format din Hanks cu 2% ser de miel, 0,25% hidrolizat de lactalbumină şi 2% extract de embrion de găină, tamponat cu 2,5% $NaHCO_3$/100 ml.

După 1—2 zile de menţinere la 36°C, celulele se dezvoltă bine şi pot fi inoculate (virus diluat 10^{-1}), după ce în prealabil mediul de creştere se înlocuieşte cu cel de menţinere format din :

ser de miel inactivat 30 min la 56°C — 2%
hidrolizat de lactalbumină — 0,5%
mediu Earle în Hanks tamponat cu 3 ml din soluţia de $NaHCO_3$ — 27,5%.

Antigenul este obţinut după 48 de ore de menţinere a culturii la 36°C. Cercetările au demonstrat faptul că în prepararea antigenului este necesară includerea depozitului celular. După autori, puterea acestui antigen variază cu compoziţia şi volumul mediului de cultură şi cu numărul şi vîrsta celulelor infectate. Prin centrifugarea produsului la turaţii mari autorii obţin date care demonstrează că activitatea fixatoare de complement este asociată în cea mai mare măsură cu componenta corpusculară, iar antigenele fixatoare de complement obţinute pe culturi tisulare sînt mult mai specifice şi mai sensibile în detectarea anticorpilor în serurile umane, decît cele preparate pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat.

Plecînd de la faptul sugerat de S. Gard că proporţia cea mai mare de antigen se găseşte în interiorul celulei, înainte ca virusul să fie eliberat, Artzet (11) (12) pune la punct o metodă foarte bună de preparare a unui antigen fixator de complement, atît din celulele renale de iepure cît şi din celulele HeLa şi KB infectate cu virusul herpetic.



Scanned with OKEN Scanner

După tripsinizare la rece, cultivă celulele renale de iepure în flacoane Roux (250 000 celule/ml) într-un mediu format din hidrolizat de lactalbumină uşor acid (pH 6,8) la care adaugă antibiotice şi ser de cal (7%) şi de iepure (5%). După 4—6 zile schimbă acest mediu cu altul ce conţine hidrolizat de lactalbumină cu pH-ul în jurul neutralităţii şi fără ser de iepure. În momentul inoculării virusului, acest mediu este înlocuit cu un altul ce nu conţine ser. Îndată ce apare efectul citopatic se recoltează lichidul de cultură şi se centrifughează ; supernatantul rezultat reprezintă antigenul S. Stratul de celule rămas pe peretele flaconului Roux se spală de 2 ori cu SST, şi se acoperă apoi cu o cantitate de 10 ml din soluţia de 0,02% de versen (acid etilendiamintetracetic) în SST ; se lasă în contact 15 min la 37°, după care se înlătură versenul prin centrifugare uşoară, iar sedimentul obţinut se suspendă în tampon veronal (NaCl—85 g, veronal—5,75 g, veronal sodic— 3,75 g, $CaCl_2$ — 0,28 g, $MgCl_26H_2O$ — 1,68 g, apă bidistilată — ad 2 000 ml) în funcţie de volumul iniţial al mediului de cultură (la 500 ml mediu se adaugă 10 ml tampon diluat 1/5 în apă bidistilată). Se fac apoi 6 îngheţuri şi dezgheţuri, iar supernatantul obţinut după centrifugarea acestei suspensii celulare constituie antigenul C, al cărui titru variază între 1/32 şi 1/128.

Folosind celulele HeLa sau KB, autorul constată că antigenul obţinut după aceeaşi tehnică de preparare este tot atît de bun ca şi cel din culturile celulare de rinichi de iepure. Singura deosebire în cultivarea virusului pe aceste suporturi celulare este că mediul conţine în plus o mică cantitate de ser (2—3%).

După autor este absolut necesară prepararea, în acelaşi mod, a unui antigen din celulele normale, neinfectate, care să fie utilizat în paralel la titrarea antigenului viral.

Ross, Russell şi Wildy (134) încearcă să obţină antigen fixator de complement pe celulele renale de hamster sugar (BHK_{21} — C_{13}) cultivate în mediul Earle cu 10% ser de viţel şi 10% fosfat triptoză. Mediul de menţinere este identic cu cel de creştere, însă conţinutul în ser de viţel este de numai 1%.

După 24 de ore de incubare la 37°C, produsul de cultură este centrifugat 10 min la 350 g, iar depozitul obţinut resuspendat în apă distilată, într-o cantitate de 10 ori mai mică decît volumul iniţial de la care s-a pornit ; se agită bine timp de 3 min la rece, după care se centrifughează 15 min la 750 g, iar supernatantul obţinut formează fracţia S_1.

Operaţia se repetă în acelaşi mod de încă două ori, obţinîndu-se fracţia S_2 şi S_3. Sedimentul de la ultima centrifugare suspendat într-un volum egal de apă distilată constituie componenta C_1.

Cercetările serologice au demonstrat că în depistarea anticorpilor fixatori de complement din infecţia herpetică primară şi recidivantă fracţia S_1 este cea mai bună. Activitatea fixatoare de complement s-ar găsi aşadar numai în fracţiunea „virală" sedimentabilă, fapt ce vine în contra-

Scanned with OKEN Scanner

dicţie cu cele arătate de Gold şi colab. (65) şi de Russell şi colab. (138), că activitatea fixatoare de complement a virusului herpetic cultivat în culturi de celule BHK se găseşte în fracţiunea „solubilă" nesedimentabilă. După Ross şi colab. antigenul menţinut la +4°C sau —70°C îşi păstrează titrul timp de 3—6 luni.

3. TEHNICI DE FIXARE A COMPLEMENTULUI

a. *Micrometoda în plăci de material plastic* a fost aplicată de Lépine, Delpy şi Artzet (99) în studiul serologic al bolilor virotice. Tehnica are aplicabilitate mai ales cînd laboratorul dispune de cantităţi mici de antigen sau ser de cercetat.

În tehnică se folosesc 0,05 ml ser diluţie 1/4, 1/8, 1/16 etc. + 1 picătură antigen + 2 picături complement (2 unităţi) + 2 picături sistem hemolitic (2% hematii + 3 unităţi ser hemolitic). Sistemul hemolitic se adaugă după ce în prealabil plăcuţele au fost menţinute timp de 18 ore la +4°C. Citirea rezultatului se face după 20—25 min de menţinere a plăcuţelor la 37°C.

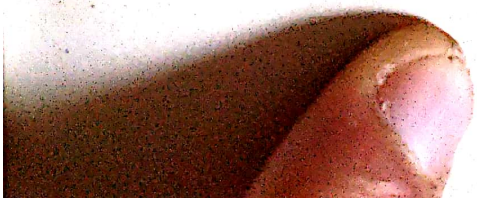
b. *Metoda Bedson şi Bland* (22). Reacţia comportă amestecul a 0,1 ml antigen + 0,1 ml ser (diluţii de la 1/10—1/160) + 0,1 ml complement (0,1 ml = 2 doze minime hemolitice) + 0,5 ml tampon veronal.

După 2—3 ore de menţinere la temperatura laboratorului se adaugă 0,2 ml sistem hemolitic (5% globule de berbec sensibilizate cu 5 doze hemolitice). Citirea rezultatului se face după incubare timp de 30 min la 37°C.

c. *Metoda Hayward* (73). Hayward foloseşte în RFC o cantitate de 0,2 ml din diluţia convenabilă de antigen + 0,2 ml din diluţiile de ser + 0,2 ml complement (2 doze minime hemolitice pentru antigenul de lichide amniotic sau alantoidian şi 2 doze şi jumătate pentru antigenul de membrană corioalantoidiană). Amestecul se menţine 18 ore la +4° şi apoi 30 min la temperatura laboratorului, după care se adaugă 0,4 ml sistem hemolitic (0,2 ml hematii 2% + 0,2 ml ser hemolitic în care sînt cuprinse 3 doze minime hemolitice). Citirea rezultatului se face după menţinerea timp de 30 min la 37° şi 2 ore la temperatura camerei.

d. *Metoda Gajdusek* (60). Din serul de cercetat se fac diluţii 1/2—1/128; se pun cantităţi de 0,1 ml în fiecare tub la care se adaugă 2 unităţi antigen conţinute în 0,1 ml şi 2 unităţi complement conţinute în 0,3 ml.

Stativul cu eprubete se lasă peste noapte la +4° şi apoi se adaugă în fiecare eprubetă cîte 0,25 ml sistem hemolitic (hematii 2% + un volum egal de ser hemolitic diluat în aşa fel încît în 0,25 ml să fie cuprinse 2 unităţi hemolitice). După 30 min de menţinere la 37°C, se citeşte rezultatul reacţiei.



Scanned with OKEN Scanner

În reacţie se folosesc următorii martori :

— martori ai puterii anticomplementare a serului (0,1 ml ser diluat 1/2 + 0,15 ml complement + 0,25 ml tampon veronal + 0,25 ml sistem hemolitic ; 0,1 ml ser diluat 1/2 + 0,3 ml complement + 0,1 ml tampon veronal + 0,25 ml sistem hemolitic),

— martori ai puterii anticomplementare a antigenului (0,15 ml complement + 0,1 ml antigen + 0,25 ml tampon veronal + 0,25 ml sistem hemolitic ; 0,3 ml complement + 0,1 ml antigen + 0,1 ml tampon veronal + 0,25 ml sistem hemolitic),

— martori ai puterii fixatoare a antigenului normal (0,1 ml ser diluat 1/2 + 0,15 ml complement + 0,1 ml antigen normal + 0,15 ml tampon veronal + 0,25 ml sistem hemolitic ; 0,1 ml ser diluat 1/2 + 0,3 ml complement + 0,1 antigen normal + 0,25 ml sistem hemolitic),

— martor al sistemului hemolitic (0,5 ml tampon veronal + 0,25 ml sistem hemolitic).

e. *Metoda Kolmer şi Boerner* (92). Se fac diluţii de ser de la 1/4 la 1/256 şi se pune în fiecare eprubetă cîte 0,25 ml din fiecare diluţie. Se adaugă apoi la fiecare eprubetă cîte 2 unităţi antigen cuprinse în 0,25 ml + 2 unităţi complement cuprinse în 0,5 ml. Stativul cu eprubete se menţine peste noapte la +4°, apoi se introduce în baia Marie la 37° timp de 15 min, după care se adaugă 0,5 ml sistem hemolitic (hematii 2% + părţi egale de ser hemolitic care conţine 2 unităţi hemolitice în 0,25 ml).

În reacţie sînt necesari :

1) martori ai puterii anticomplementare a serului :

— 0,25 ml ser diluat 1/2 + 0,5 ml complement + 0,25 ml tampon veronal + 0,5 ml sistem hemolitic ;

— 0,25 ml ser diluat 1/8 + 0,5 ml complement + 0,25 ml tampon veronal + 0,5 ml sistem hemolitic ;

— 0,25 ml ser diluat 1/16 + 0,5 ml complement + 0,25 ml tampon veronal + 0,5 ml sistem hemolitic ;

2) martor al puterii anticomplementare a antigenului :

— 0,25 ml antigen (2 unităţi în 0,25 ml) + 0,5 ml complement (2 unităţi în 0,25 ml) + 0,25 ml tampon veronal + 0,5 ml sistem hemolitic ;

3) martor al sistemului hemolitic :

— 0,5 ml complement (2 unităţi în 0,5 ml) + 0,5 ml tampon veronal + 0,5 ml sistem hemolitic ;

4) martori hematii :

— 0,5 ml complement (2 unităţi în 0,5 ml) + 0,75 ml tampon veronal + 0,25 hematii 2%.

Nu trebuie însă omisă reacţia serului de cercetat + antigenul martor (normal), reacţiile serului sigur pozitiv, cu titru cunoscut, şi ale serului negativ + antigenul viral.

Scanned with OKEN Scanner

Citirea rezultatului reacției se face în momentul cînd hemoliza este totală în tuburile martore *a*, *b* și *c* și absentă în tubul martor *d*.

f. *Metoda Dudgeon* (48). Necesită titrarea prealabilă a complementului în prezența antigenului (diluat încît să conțină 8 unități pe unitatea de volum) și a serului normal diluat 1/2. După 1 oră de menținere la 37°C se adaugă sistemul hemolitic preparat cu 30 min înainte de utilizare (hematii de berbec 3% + un volum egal de ser hemolitic ce conține 5 doze minime hemolitice). Tubul în care se observă o hemoliză 50% reprezintă o doză de complement.

În RFC se utilizează 0,1 ml ser de cercetat (diluții 1/2—1/128) + 8 unități antigen conținut în 0,1 ml și 2 unități complement conținute în 0,1 ml. După 18 ore de menținere la +4°C se adaugă 0,2 ml sistem hemolitic.

Rezultatul reacției se citește după 30 min de menținere la 37°C (se ține seama de hemoliza 50%).

g. *Metoda Ellison și colab.* (50). Se folosesc 3 rînduri de eprubete. În primul rînd se pun cîte 0,5 ml din diluțiile seriate de ser + 0,5 ml antigen + 0,3 ml complement (5 unități hemolitice 50).

În rîndul 2 se pun cîte 0,5 ml din diluțiile seriate de ser + 0,5 ml tampon + 0,3 ml complement (martorul anticomplementarității serului).

În rîndul 3 se pun cîte 0,5 ml din diluțiile seriate de ser + 0,8 ml tampon veronal.

În reacție sînt absolut indicați: martorul de complement și martorul de antigen.

După 18 ore de menținere la +4° se adaugă în fiecare eprubetă cîte 0,2 ml sistem hemolitic (globule de berbec sensibilizate și astfel standardizate încît să conțină 10^6 celule/ml).

Se agită și se menține apoi o oră la 37°C, după care eprubetele se centrifughează la 2 000 t/min pentru sedimentarea celulelor nehemolizate. Se face apoi densitatea optică cu ajutorul unui spectrofotometru la 550 mμ și se calculează hemoliza cu ajutorul nomografului (fig. 122).

Titrul se exprimă ca o reciprocă a diluțiilor unde apare 50% hemoliză.

Diluția rezultă din datele următoare:

dacă a = cu diluția care dă x hemoliză (mai puțin de 50%) și

b = cu diluția care dă y hemoliză (mai mult de 50%) atunci:

$$\frac{50 - y}{x - y} = z$$ (distanța proporțională între a și b) și log titrului =

$$= \log b - z (\log a - \log b).$$

h. *Metoda Artzet* (12). Este cea mai folosită în laboratoarele de specialitate, datorită utilizării culturilor celulare în prepararea unei cantități suficiente de antigen. Reacția se execută în tuburi de hemoliză (9 × 90 mm), componentele sale fiind diluate în tampon veronal (106).

Scanned with OKEN Scanner

Titrarea complementului. Din diluţia iniţială a complementului (de obicei 1/80) se fac diluţii în progresie aritmetică de 0,02 ml (se merge de la 0,08 la 0,30 ml).

Se ajustează volumul de 0,4 ml cu ajutorul tamponului veronal; stativul cu eprubete se menţine apoi 1 oră la 37°, după care se adaugă

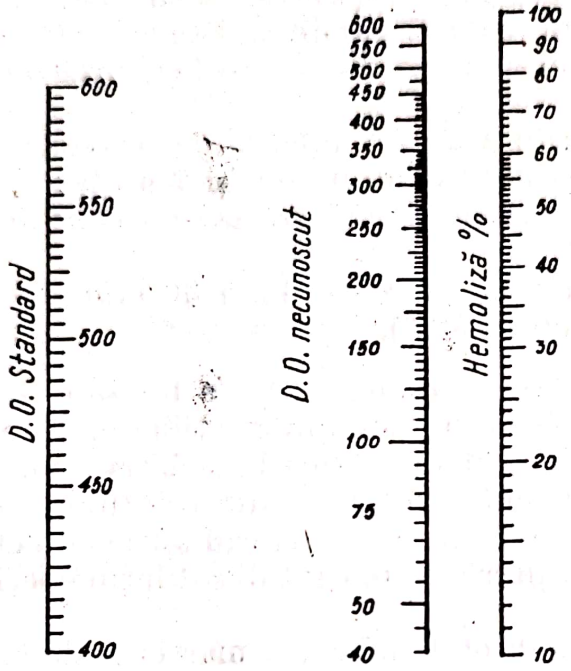


Fig. 122. — Nomograf folosit în calculul hemolizei %.
Ellison şi colab., 1959.

hematiile sensibilizate; citirea se face după menţinerea stativului timp de 30 min la 37° (unitatea complementului fiind egală cu cea mai mică cantitate de complement care determină o hemoliză totală).

În reacţia de fixare a complementului se vor utiliza 2 unităţi complement conţinute în 0,2 ml.

Prepararea hematiilor. După recoltare în lichidul Alsever (pot fi conservate mai mult timp la +4°C) se fac 3 spălări în tampon veronal. Depozitul rezultat la ultima centrifugare este folosit la obţinerea unei suspensii 2% în tampon veronal; pentru sensibilizare, această suspensie este amestecată în părţi egale cu serul hemolitic.

Serul hemolitic este diluat în aşa fel încît 3 unităţi hemolitice să fie cuprinse în 0,1 ml.

Titrarea antigenului se face prin metoda bidimensională, care comportă diluţii crescînde (progresie geometrică binară) ale serului şi antigenului, în care unitatea antigenică este reprezentată de diluţia de antigen care dă o fixare completă în prezenţa diluţiei celei mai mari de ser.

Scanned with OKEN Scanner

Executarea reacţiei de fixare a complementului

RFC comportă amestecul a 0,1 ml ser + 0,1 ml antigen + 0,2 ml complement.

Acest complex antigen-ser-complement este menţinut timp de 18 ore la +4°C, după care se adaugă 0,2 ml sistem hemolitic.

După menţinerea timp de 15—30 min la 37° se face citirea rezultatului şi se notează astfel: 0 = hemoliza totală, 4 = absenţa totală a hemolizei, 1, 2, 3 = grade intermediare.

În reacţie sînt necesari:

— *martor al titrului complementului* (4 tuburi în care se introduc 0,05; 0,1; 0,15 şi 0,2 ml complement ce corespunde la 0,5, 1,5 şi 2 unităţi de complement).

Se ajustează apoi volumul final de 0,4 ml cu tampon veronal şi se adaugă 0,2 ml sistem hemolitic.

— *martor al anticomplementarităţii serului*

(0,1 ml din diluţiile de ser + 0,2 ml complement + 0,1 ml tampon veronal + 0,2 ml sistem hemolitic);

— *martor al puterii anticomplementare a antigenului* (0,1 ml din diluţiile de antigen + 0,1 ml tampon veronal + 0,2 ml complement + 0,2 ml sistem hemolitic).

4. IDENTITATEA ÎNTRE REZULTATELE OBŢINUTE PRIN REACŢIILE DE FIXARE A COMPLEMENTULUI ŞI SERONEUTRALIZARE

S-a demonstrat încă de mult de către Hayward (74), Dudgeon (48) şi Holzel şi colab. (77), că între rezultatele obţinute prin RFC şi cele prin reacţia de seroneùtralizare există un paralelism.

Hayward (73) (74) constată astfel că anticorpii fixatori de complement sînt prezenţi în proporţie de 82,5% în sîngele indivizilor aleşi la întîmplare, cifră ce corespunde cu cea găsită de Burnet şi Lush (36) prin reacţia de neutralizare în serurile bolnavilor din Spitalul din Melbourne.

De altfel, cele 10 seruri testate de Hayward atît prin RFC cît şi prin reacţia de neutralizare au arătat o identitate perfectă între rezultatele obţinute prin ambele metode.

Sosa-Martinez şi Lennette (157) examinează prin RFC şi seroneutralizare 72 de indivizi de diferite vîrste, cu infecţii herpetice sau cu boli clinice similare (herpes-zoster, varicelă). Ei au găsit o corelaţie relativă între anticorpii fixatori de complement şi cei neutralizanţi. În 6 probe recoltate însă în perioada de debut a infecţiei herpetice primare, autorii pun în evidenţă prezenţa anticorpilor neutralizanţi, cei fixatori de complement fiind absenţi. În probele de sînge recoltate însă în perioada de convalescenţă a bolii de la aceiaşi indivizi, autorii constată că anticorpii fixatori de complement apar în momentul cînd titrul anticorpilor neutralizanţi este foarte ridicat.

Scanned with OKEN Scanner

Folosind ambele reacţii serologice în detectarea anticorpilor herpetici la 18 bolnavi cu afecţiuni neherpetice, autorii constată absenţa atît a anticorpilor neutralizanţi cît şi a celor fixatori de complement, în ambele probe de sînge. Aceleaşi rezultate au fost obţinute în serurile recoltate în perioada acută de la 4 din bolnavii cu infecţie herpetică tipică.

Gajdusek, Robbins şi Robbins (60) obţin de asemenea rezultate identice cu ambele metode de laborator; subliniază însă faptul că în cazul în care titrul anticorpilor neutralizanţi este scăzut, RFC dă rezultate în general negative. De altfel Kipping şi Downie (90) au constatat că în faza acută a erupţiei variceliforme Kaposi, în timp ce reacţia de seroneutralizare este pozitivă, RFC este negativă, ea pozitivîndu-se în faza de convalescenţă a bolii, deci cînd prima din aceste reacţii arată titrurile maxime de anticorpi.

Schmidt şi Lennette (142), studiind 365 de seruri, atît prin reacţia de neutralizare colorimetrică cît şi prin RFC, constată prezenţa unei corelaţii liniare între titrul anticorpilor decelaţi prin ambele metode.

Modi şi Tobin (108) evidenţiază prezenţa anticorpilor seroneutralizanţi în 80 din cele 100 de seruri cercetate; 77 din aceste 80 de seruri au reacţionat pozitiv şi în RFC.

Concordanţa rezultatelor obţinute cu ambele reacţii îi determină pe autori să considere fixarea de complement ca cea mai indicată în diagnosticul infecţiei cu virus herpetic *simplex*, tehnica de lucru fiind mult mai uşoară decît seroneutralizarea.

Cercetările la Sosa-Martinez şi Lennette şi cele ale lui Gajdusek şi colab. au arătat însă faptul că între titrurile anticorpilor fixatori de complement şi cei seroneutralizanţi nu există o corelaţie absolută în cazul cînd în această din urmă reacţie se foloseşte tehnica ser constant — diluţii variate de virus.

Corelaţia este absolută numai în cazul cînd în reacţia de seroneutralizare se foloseşte tehnica diluţii de ser — doză constantă de virus.

D. HEMADSORBŢIA MIXTĂ

Tehnica a fost folosită de Espmark (52) în punerea în evidenţă a anticorpilor herpetici; autorul face diluţii seriate de ser pe care le adaugă în tuburile de culturi celulare inoculate cu virus herpetic, după apariţia efectului citopatic. După spălarea tuburilor de cultură (vezi hemadsorbţia mixtă în identificarea virusului) adaugă eritrocitele-indicator (prepararea lor deosebindu-se de cea folosită în identificarea virusului prin faptul că se utilizează un ser antieritrocite de oaie şi un ser antiglobulină umană preparat pe iepure). Titrul anticorpilor serici obţinuţi cu această reacţie este reprezentat de diluţia serului la care s-a observat fenomenul de hemadsorbţie al eritrocitelor-indicator.

Scanned with OKEN Scanner

Tehnica s-a dovedit a fi bună în testarea anticorpilor herpetici, rezultatele fiind aproape egale cu cele obţinute în seroneutralizare şi fixare a complementului.

E. TESTUL DE HIPERSENSIBILITATE CUTANATĂ

Testul cutanat este folosit în mod curent în diagnosticul specific al infecţiei herpetice. La indivizii care au avut o infecţie herpetică, inocularea intradermică a virusului herpetic inactivat este în general urmată de apariţia unei reacţii locale specifice, de tip alergic.

În 1944 Nagler (114) aduce primele date obţinute cu acest test pe indivizi cu leziuni herpetice. Pentru prepararea antigenului autorul foloseşte ouă embrionate de 11 zile pe care le inoculează pe membrana corioalantoidă. La 3 zile de la infectare sacrifică ouăle şi recoltează membranele corioalantoide. Suspensia obţinută (1 ml sol. fiziologică la o membrană) este centrifugată 20 min la 4 000 t/min; supernatantul diluat 1/10 a fost utilizat în testul cutanat după prealabila sa inactivare prin căldură (70°C timp de 2 ore). Rezultatele inoculărilor intradermice cu acest antigen herpetic (0,1 ml) au fost citite după 24—48 de ore.

Brown (31) foloseşte de asemenea ca antigen suspensia de membrane corioalantoide recoltate la 3 zile de la infectarea ouălor (3 membrane la 5 ml soluţie fiziologică cu 10% ser de cobai). După menţinere timp de 24 de ore la +4°C supernatantul obţinut este încălzit timp de 30 min la 56°C şi folosit ca antigen.

Ulterior, Nagler (115), luînd în considerare atît faptul constatat de Anderson (6) că virusul herpetic *simplex* se multiplică activ în sacul amniotic al ouălor embrionate în vîrstă de 13 zile inoculate pe această cale, cît şi faptul semnalat de Beveridge şi Burnet (24), că lichidul amniotic al ouălor embrionate în vîrstă de 8 zile, inoculate intraamniotic, prezintă o cantitate scăzută de proteine, iar virusul se găseşte într-un titru foarte ridicat (10^{-7} —10^{-8}/ml), încearcă să folosească ca antigen în testul cutanat, lichidul amniotic. Studiază mai întîi creşterea virusului în ouăle embrionate infectate pe cale intravitelină şi constată că la 3 zile de la inoculare virusul se găseşte într-un titru foarte ridicat, iar volumul lichidului amniotic este dublu (2 ml) în comparaţie cu acela obţinut după inocularea directă în sacul amniotic. Acest lichid amniotic, cu un titru de cel puţin 10^7 particule virotice/ml, a fost apoi inactivat prin încălzire timp de 2 ore la 65°. O cantitate de 0,1 ml din diluţia 1/50 de antigen astfel obţinut a fost administrată intradermic la indivizi cu şi fără antecedente de infecţie herpetică, la care în prealabil s-au făcut şi testările anticorpilor seroneutralizanţi. La 24—48 de ore de la inocularea antigenului, s-a făcut citirea şi măsurarea diametrului reacţiei.

Rezultatele pozitive obţinute cu antigenul virotic la indivizii cu herpes labial în antecedente, faţă de rezultatele negative la toţi indivizii

Scanned with OKEN Scanner

normali testaţi, au demonstrat specificitatea antigenului şi în acelaşi timp superioritatea sa faţă de antigenele de membrană corioalantoidă care, datorită cantităţii mari de proteină, determină un procentaj ridicat de reacţii nespecifice.

La copii, autorul obţine un test cutanat pozitiv în 90% din cazuri la cei peste 4 ani, în 18% la cei între 2 şi 4 ani şi negativ sub 2 ani.

Administrînd subcutanat la om 0,5 ml, 1 ml şi 1 ml, la interval de o săptămînă, din lichidul amniotic formolat 0,08%, Nagler nu obţine rezultate satisfăcătoare de imunizare activă, apariţia de noi leziuni herpetice nefiind împiedicată.

Rose şi Molloy (132) folosesc, de asemenea cu rezultate bune, lichidul alantoidian recoltat de la ouă inoculate cu virus (diluţia 10^{-5}) şi menţinute la 37°C; administrarea intradermică a produsului după o menţinere de 2 ore la 56° determină apariţia unei reacţii alergice locale.

Reacţia cutanată obţinută cu antigene preparate fie din suspensiile de membrană corioalantoidă, fie din lichidele amniotic sau alantoidian au dus la concluzia că ea este determinată de conţinutul în particule virotice al acestor antigene. Totuşi, datorită faptului observat de autori că preparatele purificate (particulele virotice spălate şi concentrate) au determinat reacţii cutanate inconstante, în comparaţie cu antigenele obţinute din lichidele oului de găină embrionat ce conţineau relativ mai puţin virus, a sugerat ideea că antigenul responsabil de o reacţie pozitivă nu s-ar datora particulelor virotice intacte, ci antigenului solubil.

Jawetz, Coleman şi Allende (81) caută să verifice aceasta; inoculează intravitelin ouă de găină embrionate în vîrstă de 7 zile cu două tulpini de virus herpetic (20—100 DIC_{50} /ml), pe care apoi le menţin timp de 5 zile la +36°C. Lichidele alantoidian şi amniotic recoltate după această perioadă de timp au fost supuse unei centrifugări la 2 000 t/min timp de 10 min, iar supernatantul rezultat a fost recentrifugat cu o centrifugă angulară la 12 500 t/min timp de o oră. Supernatantul obţinut şi sedimentul readus la volumul iniţial cu o soluţie salină tamponată pH 7,2 au fost folosite ca antigene după prealabila lor inactivare cu raze ultraviolete (perioada de expunere fiind cu de două ori şi jumătate mai mare decît timpul minim necesar inactivării tuturor particulelor virotice) şi tratate apoi cu mertiolat în concentraţie de 1/25 000.

Testările făcute de autori în ceea ce priveşte conţinutul în virus al ambelor produse, înainte de a fi supuse inactivării, au arătat că supernatantul conţine aproximativ 5% din cantitatea de virus restul fiind prezent în sediment.

Testele cutanate practicate de autori pe indivizi sănătoşi cu ambele antigene au arătat că zona de eritem apărută în urma inoculării intradermice a supernatantului are un diametru mediu de 2,5 ori mai mare decît aceea obţinută cu produsul sedimentat. Rezultatele au demonstrat că proprietatea de a determina o reacţie cutanată este datorită unei substanţe solubile nesedimentabile şi distincte de particulele virotice; substanţa este

Scanned with OKEN Scanner

termostabilă (rezistă la temperatura de 56° timp de 2 ore); reacţiile cutanate practicate cu supernatantul astfel încălzit sînt identice ca mărime şi aspect cu acelea determinate de supernatantul neîncălzit.

Studiind, la diverse intervale de timp, dezvoltarea în oul de găină embrionat a proprietăţii reactiv-cutanate a virusului herpetic, autorii constată apariţia sa la 48 de ore de la inocularea ouălor, moment în care virusul infectant nu poate fi decelat. Aceasta sugerează autorilor că antigenul reactiv-cutanat nu ar fi altceva decît virusul incomplet, neinfectant. El fixează complementul, este nepatogen pentru şoarecele inoculat intraperitoneal, intravenos sau intracerebral şi este neimunizant pentru iepure şi şoarece.

Subladze, Khuan şi Chzhu-Shan (159), folosind ca antigen suspensia formolată de creier de şoarece infectat cu virusul herpetic *simplex*, obţin reacţii cutanate pozitive în 80% din 106 indivizi cu antecedente de infecţie herpetică şi în 32% din 103 indivizi fără infecţie herpetică în antecedente. După aceşti autori însă, cele 20% reacţii negative la primul lot de indivizi testaţi s-ar datora unei diferenţe antigenice între virusul folosit în testul cutanat şi acela care provocase boala herpetică.

Faptul că reacţia a fost pozitivă, la lotul de indivizi cu antecedente herpetice, numai în 80% din cazuri, a fost explicat de Subladze şi colab. prin aceea că în antigenele folosite în testul cutanat nu erau prezente toate variantele de virus herpetic; la lotul al doilea, pozitivitatea relativ ridicată se explică prin prezenţa formelor inaparente de infecţie herpetică.

După aceşti autori, testul cutanat poate fi folosit ca metodă valoroasă de diagnostic în gingivo-stomatite, vulvo-vaginite, eczemă şi encefalite, cu condiţia ca antigenul să fie polivalent, dată fiind existenţa diferenţelor antigenice între tulpinile de virus herpetic.

Anderson şi Kilbourne (7) prepară, din lichidul de culturi celulare de rinichi de iepure infectate cu virus herpetic *simplex*, un antigen cu o concentraţie mică de proteină pe care-l utilizează în testul cutanat de diagnostic. Antigenul a fost inactivat cu raze ultraviolete şi supus apoi unei ultracentrifugări pentru separarea antigenului corpuscular de cel solubil.

La 8 din cei 11 indivizi cu anticorpi neutralizanţi în sînge sau cu antecedente de infecţie herpetică, cărora li s-a administrat acest antigen, reacţia cutanată a fost pozitivă; testul cutanat cu antigenul normal preparat în acelaşi mod a fost însă negativ.

E de semnalat că reacţiile cele mai intense au fost obţinute cu fracţiunea solubilă a antigenului virotic.

Deşi puţin experimentat, antigenul obţinut din lichidul de cultură celulară pare să fie tot atît de bun ca şi celelalte antigene.

Lausch, Swyers şi Kaufman (95) prepară pe fibroblaste de embrion de găină (supernatantul rezultat după centrifugare timp de 30 min la 30 000 t/min este dializat peste noapte faţă de o soluţie fiziologică pH 7,2 şi menţinut apoi la —60°C) un antigen pe care-l testează pe cobaii în preala-

Scanned with OKEN Scanner

bil sensibilizaţi cu o cantitate minimă de virus herpetic (0,1 ml inoculaţi intradermic).

Autorii utilizează antigenul astfel obţinut după prealabila încălzire a sa timp de 2 ore la 56°C, reducînd astfel infectivitatea sa de la aproximativ 10^5 unităţi formatoare de plaje la mai puţin de 10 unităţi formatoare de plaje/0,2 ml.

În prima săptămînă după sensibilizarea cobaiului, antigenul este capabil să determine la 24 de ore de la inocularea intradermică o reacţie cutanată maximă (fig. 123) de hipersensibilizare (15,4 mm în diametru), caracterizată din punct de vedere citologic printr-o infiltraţie cu celule mononucleare.

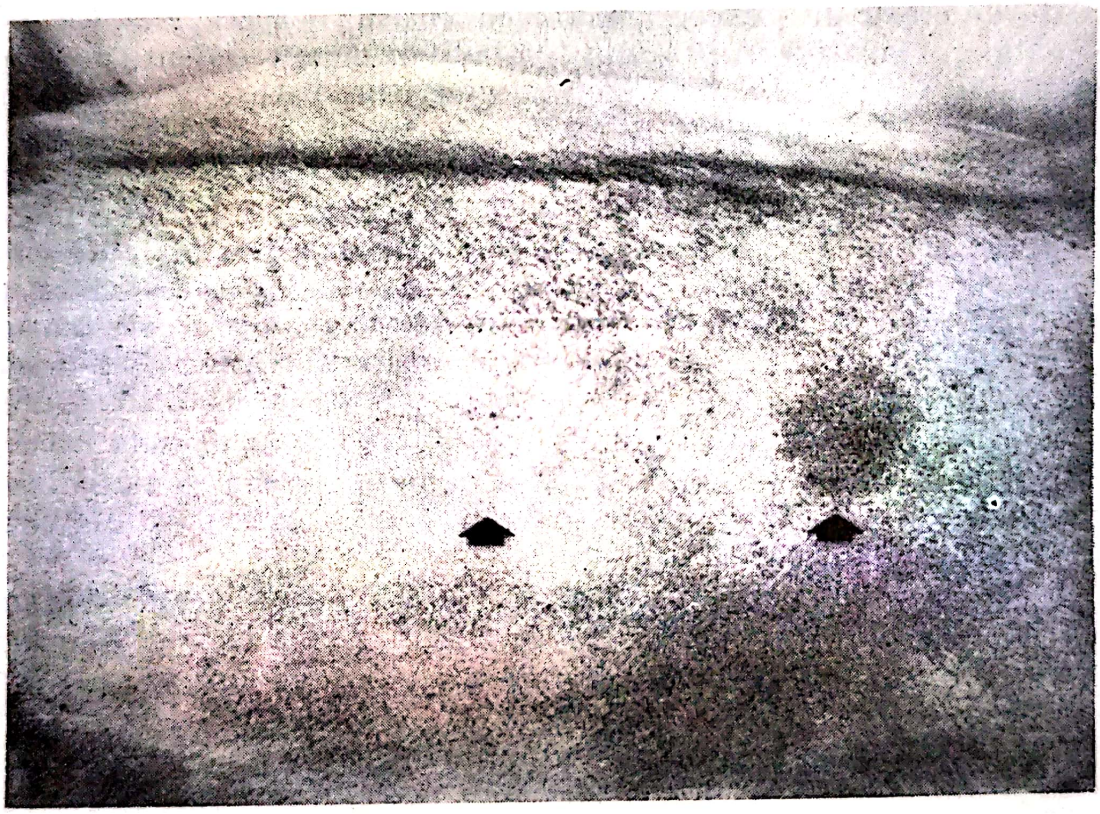


Fig. 123. — Reacţie cutanată, 48 de ore de la inocularea celulelor de exsudat peritoneal de la cobaii donatori sensibilizaţi faţă de herpes *simplex*. În dreapta (↑) se observă reacţia pozitivă (locul inoculării antigenului herpetic); în stînga (↑) reacţie negativă (locul inoculării fibroblastelor normale de embrion de găină). Lausch şi colab., 1966.

După Lausch, Swyers şi Kaufman răspunsul de hipersensibilizare cutanată faţă de antigenul herpetic este de tip întîrziat.

Cercetări histopatologice întreprinse de Prunieras şi colab. (124) au demonstrat că local este vorba de o reacţie de tip reticular cu celule histiocitare şi monocitoide, în special în jurul nervilor, fiind prezente de asemenea leziunile prenecrotice ale glandelor sudoripare.

Scanned with OKEN Scanner

Cu toate că unii autori pun în discuţie specificitatea acestui test, el este totuşi recomandat în practica curentă. Zona eritematoasă şi edemul, apărute la 24—48 de ore de la inocularea intradermică a antigenului viral şi persistenţa lor aproximativ 7 zile, trebuie interpretate ca o reacţie pozitivă. În general, reacţia apare pozitivă la persoanele care au anticorpi seroneutralizanţi (131); cu toate acestea, reacţii negative au fost totuşi obţinute şi la persoane care au anticorpi în sînge. E recomandabil însă ca la prepararea antigenului să se folosească un material al cărui titru infectant să fie mai mare de 10^5 unităţi infectante/ml.

Odată preparat, antigenul este stabil la —20°C timp de cîteva luni. De regulă, antigenul martor nu determină nici o reacţie, însă în cazuri rare administrarea lui este urmată imediat de o mică zonă congestivă care dispare după cîteva ore.

BIBLIOGRAFIE

1. Adair, C. V., Gauld, R. L., Smadel, J. E. — Ann. Inst. Med., 1953, **39**, 675.
2. Aderca, I., Ianconescu, M. — Microbiol. epidemiol. parazitol., 1960, **5**, 155.
3. Aderca, I., Ianconescu, M., Bîrcă, A. — St. cerc. inframicrobiol., 1960, **11**, 243.
4. Afzelius-Alm,L. — Acta med. scand. Suppl. 1951, 140.
5. Akazaki, K. — Arch. exp. Zellforsch., 1937, 20, 89.
6. Anderson , K. — Amer. J. Path., 1940, **16**, 137.
7. Anderson, W. A., Kilbourne, E. D. — J. Invest. Derm., 1961, **37**, 28.
8. Andrewes, C. H. — J. Path. Bact., 1930, **33**, 301.
9. Andrewes, C. H., Carmichael, M. B. — Lancet, 1930, **1**, 857.
10. Armstrong, C. — Publ. Hlth. Rep., 1943, **58**, 16.
11. Artzet, F. — Ann. Inst. Pasteur, 1960, **99**, 777.
12. Artzet, F. — *Recherches sur les antigènes viraux fixant le complément. Etude des virus herpétiques et poliomyélitique*. Thèse Sciences, Paris, 1961.
13. Baker, W. H. J., Lawton, A. M., McCarthy K. — Brit. med. J., 1952, **2**, 1334.
14. Balducci, D., Tyrell, D.A.J., Stuart-Harris, G. H. — Arch. ges. Virusforsch., 1956, **7**, 28.
15. Barron, A. L., Karzon, D. T. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1959, **100**, 316.
16. Barski, G., Lamy, M., Lépine, P. — Ann. Inst. Pasteur, 1955, **89**, 415.
17. Barski, G., Maurin, J., Lépine, P. — Ann. Inst. Pasteur, 1949, **76**, 221.
18. Beale, A. J., Hair, H. C. — Canad. Med. Ass. J., 1956, **74**, 443.
19. Becker, W. B. — Sth afr. Med. J., 1966, **40**, 109.
20. Becker, W. B., Naudé, W. du T., Kipps, A., McKenzie, D.— Sth afr. Med. J., 1963, 37, 74.
21. Bedson, S. P. — Brit. J. exp. Path., 1931, **12**, 254.
22. Bedson, S. P., Bland, J.O.W. — Brit. J. exp. Path., 1929, **10**, 393.
23. Bedson, S. P., Crawford, G. J. — Brit. J. exp. Path., 1927, **8**, 138.
24. Beveridge, W. I. B., Burnet, F. M. — Medical Research Council, Report Series nr. 256, London, His Majesty's Stat Off., 1946, p. 16 şi 30.
25. Biegeleisen, Jr. J. Z., Scott, L. V., Lewis, Jr. V., — Science, 1959, **129**, 640.
26. Black, W. C. — J. Pediat., 1942, **20**, 145.
27. Blanc G. — C. R. Acad. Sci., 1921, *172*, 725.
28. Boake, W. C., Dudgeon, J. A., Burnet, F. M. — Lancet, 1951, **1**, 383.
29. Brain, R. T. — Brit. J. exp. Path., 1932, **13**, 166.
30. Brain, R. T., Dudgeon, J. A., Phillpott, M. G. — Brit. J. Dermat., 1950, **62**, 203.

Scanned with OKEN Scanner

VIRUSUL HERPETIC B

HERPES SIMIAE

Herpesul *simiae* este considerat ca o variantă a virusului herpetic uman ; determină o boală spontană la maimuță și este transmis omului prin mușcătura acestui animal sau prin manipularea țesuturilor sale infectante.

Din punct de vedere clinic, contrar gazdei naturale — maimuța — boala evoluiază la om sub forma unei encefalomielite, în majoritatea cazurilor mortală.

Istoric. În 1933 Gay și Holden (19) descriu pentru prima dată apariția unei encefalomielite letale la om după mușcătura unei maimuțe aparent sănătoase.

Din creierul acestui caz autorii izolează un inframicrob pe care-l denumesc virusul W și-l consideră ca o tulpină aparte de virus herpetic *simplex*.

În anul următor, Sabin și Wright (43) aduc cazul unei mielite ascendente letale la om, apărută la 18 zile de la mușcătura unei maimuțe *rhesus*, de asemenea aparent sănătoasă. Din creierul și măduva acestui caz s-a izolat un virus pe care autorii l-au denumit virusul B.

Sabin (40), cercetînd acest virus, constată că el este înrudit imunologic cu virusul herpetic *simplex* și nu cu cel al pseudoturbării.

În 1949, Sabin (41) aduce însă un al doilea caz de infecție cu virus B. Din 1933 pînă în 1949 cercetările de laborator asupra acestui virus nu au mai preocupat pe oamenii de știință.

Ulterior, Breen, Lamb și Otaki (7), Pierce, Pierce și Hull (35), Nagler și Klotz (34), Hummeler, Davidson, Henle, La Bocetta și Ruch (23) izolează acest virus tot de la oameni cu infecții accidentale.

Utilizarea maimuțelor pe scară mai largă în laboratoarele de virusologie a făcut ca în ultimul timp virusul herpetic B să preocupe iarăși pe oamenii de laborator, datorită pe de o parte răspîndirii sale sub formă latentă în colectivitățile de maimuțe, și deci posibilității mult mai mari de infectare a personalului de laborator care manipulează aceste animale, iar pe de altă parte datorită pericolului prezenței acestui virus în culturile celulare de maimuță folosite în preparări de vaccinuri cu aplicabilitate în teren.

Astfel, Melnick și Banker (32), Wood și Shimada (47), Keeble, Christofinis și Wood (26), Malherbe și Harwin (30), Endo, Kamimura, Aoyama,

Hayashida, Kinjo, Ono, Kotera, Susuki, Tajima şi Ando (13) îl izolează frecvent din ţesuturile maimuţelor.

De la descoperirea virusului şi pînă astăzi s-au semnalat numeroase cazuri de infecţie de laborator cu virus herpetic B, însă izolări de virus nu au fost obţinute decît la cîteva din ele.

Davidson şi Hummeler (11) au posibilitatea de a studia din punct de vedere histopatologic şi serologic 12 cazuri cu infecţie de laborator cu acest virus.

A. VIRUSUL

1. DIMENSIE ŞI STRUCTURĂ

Virusul herpetic B are aceeaşi dimensie şi structură ca şi virusul herpetic *simplex*. S-a stabilit prin filtrarea prin membrană gradocol că virusul are o dimensie de 125 mμ.

Cu ajutorul microscopului electronic, Reissig şi Melnick (39) constată că în celulele renale ale maimuţei infectate cu virus herpetic B se găsesc particule sferice cu centrul dens, similare celor descrise de Morgan şi colab. (33) în herpesul *simplex*.

Autorii descriu : 1) particule cu o singură membrană în jur, cu o dimensie de 60 — 100 mμ (particule incomplete), 2) particule cu două membrane în jur cu o dimensie de 120—180 mμ şi 3) particule cu un corp central dublu, de 180 mμ.

Autorii observă primele două grupuri de particule atît în nucleu cît şi în citoplasmă (fig. 124 şi 125), în timp ce ultimele în citoplasmă şi la periferia membranei celulare (fig. 126).

Pe preparatele de celule renale de şoarece infectate cu virus herpetic B, Endo şi colab. (12) stabilesc că particulele virotice din nucleoplasmă au o dimensie de 100 × 70 mμ.

2. CONSERVARE

Virusul herpetic B îşi păstrează puterea sa patogenă o perioadă lungă de timp prin menţinerea în glicerină 50%, sub formă congelată (—70°) sau liofilizată. El este sensibil la acţiunea eterului. Temperatura de 4°C inactivează însă virusul în două săptămîni de conservare.

După Hummeler şi colab. (23) virusul poate fi conservat mult mai bine sub formă de fragmente de ţesut menţinute în glicerină decît sub formă congelată.

Krech şi Lewis (27), Pierce şi colab. (35) dovedesc că faţă de formaldehidă virusul herpetic este de 4 ori mai sensibil decît virusul poliomielitic.

Scanned with OKEN Scanner

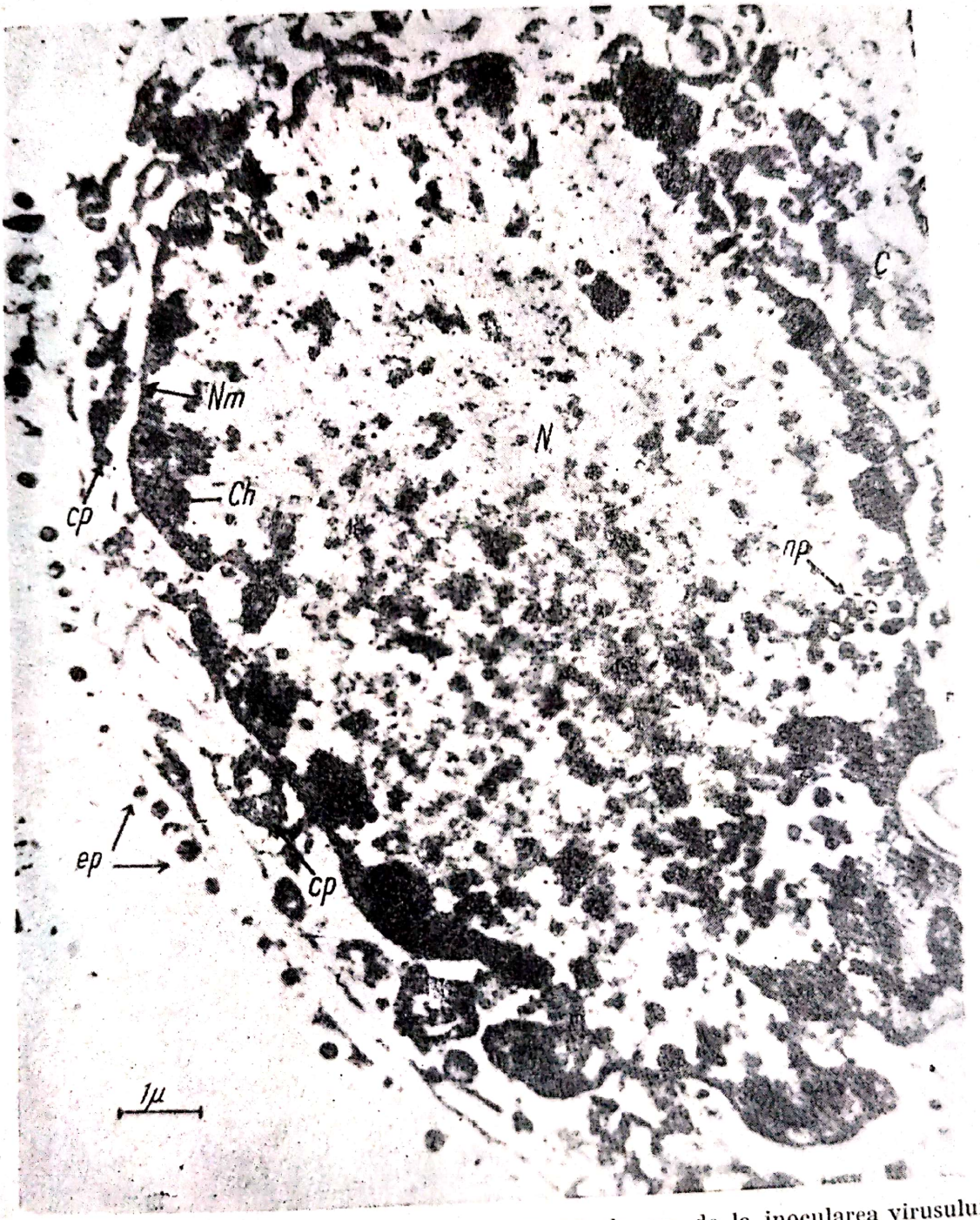


Fig. 124. — Celule renale de maimuță, 36 de ore de la inocularea virusului herpetic B. Se observă particule de virus cu dimensiuni de 120—180 mμ ingrămădite la periferia nucleului. Aceleași particule sînt prezente de asemenea în citoplasmă și la periferia celulei. *N*, nucleu; *C*, citoplasmă; *Nm*, membrană nucleară; *ch*, cromatină marginată; *cp*, particule citoplasmice; *ep*, particule extracelulare; *np*, particule nucleare. Reissig și Melnick, 1955.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 125. — Celule renale de maimuță, 14 ore de la inocularea virusului herpetic B. Se observă marginația cromatinei și un corp opac neregulat către zona marginală a nucleului, Particule mici și izolate de virus sînt prezente în zona centrală a nucleului; unele din particulele de virus, înconjurate de una sau două membrane, sînt risipite izolat sau în grupuri în citoplasma celulei. *N*, nucleu; *cp*, particule citoplasmice; *np*, particule nucleare; *ep*, particule extracelulare; *mi*, mitocondrii; *Nm*, membrană nucleară; *Cm*, membrană celulară, Reissig și Melnick, 1955.

Scanned with OKEN Scanner

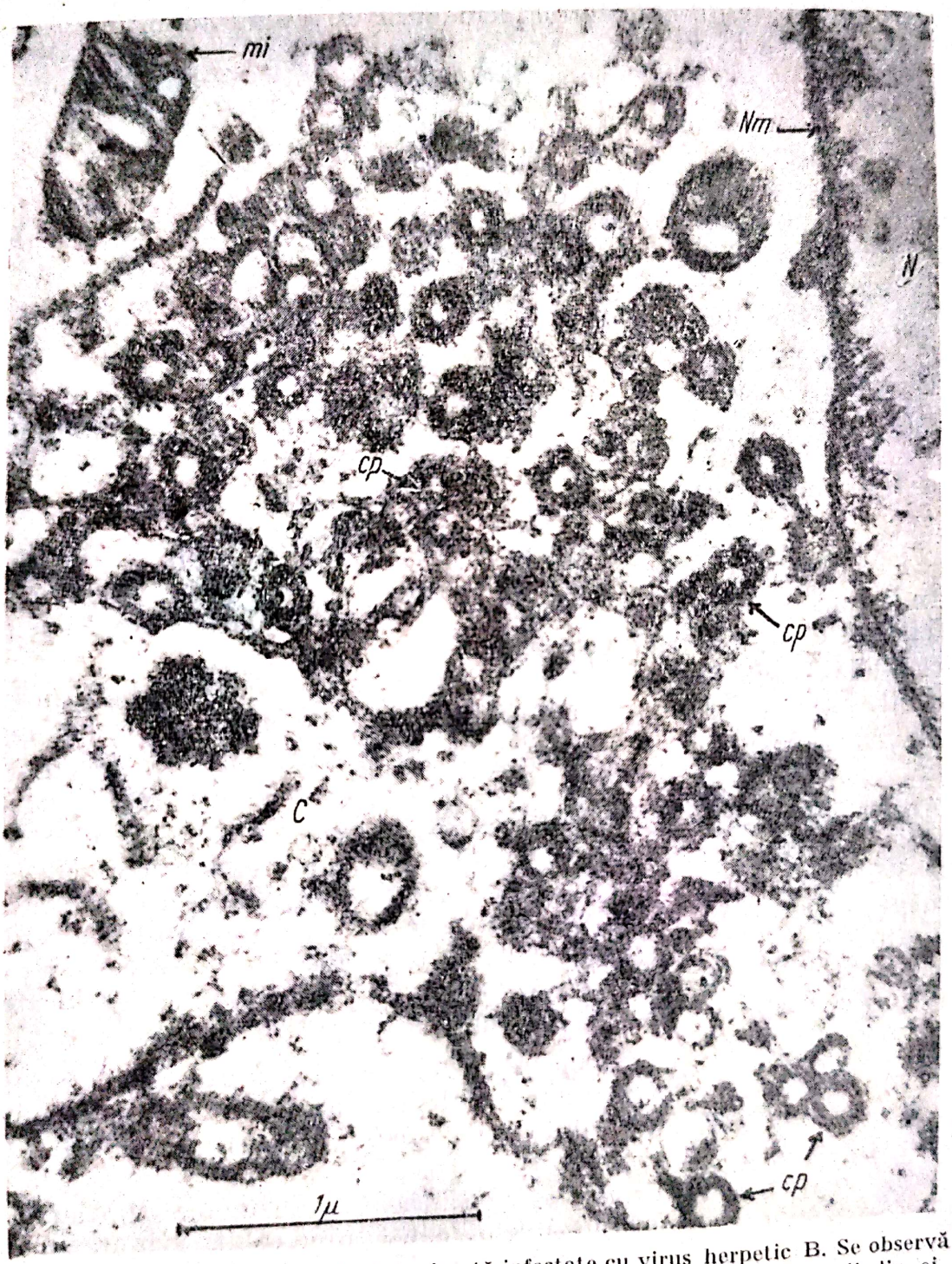


Fig.126. — Celule renale de maimuță infectate cu virus herpetic B. Se observă prezența în citoplasmă a corpusculilor elementari variați ca dimensie, unii din ei înconjurați de duble membrane. *mi*, mitocondrii; *Nm*, membrană nucleară; *cp*, particule citoplasmice; *C*, citoplasmă. Reissig și Melnick, 1955.

Scanned with OKEN Scanner

Menţinut de 36°C în contact cu formaldehidă 1/9 000 virusul este inactivat în 48 de ore (35); în absenţa formaldehidei inactivarea este obţinută după 9 zile de menţinere la 36°C.

3. CULTIVARE ÎN OUL DE GĂINĂ EMBRIONAT

Virusul herpetic B cultivă foarte uşor în oul de găină embrionat, prin inoculări pe membrana corioalantoidă (8). El determină la locul inoculării apariţia de vezicule similare cu cele produse de virusul herpetic *simplex*.

Tulpinile adaptate la ou, inoculate pe membrana corioalantoidă, provoacă mortea embrionilor în 6 zile la infectare şi leziuni necrotice în viscere.

Reagan şi Bruckner (38), înoculînd tulpina 1 de virus herpetic B pe cale intracerebrală la pui de găină în vîrstă de o zi, reproduc encefalita herpetică experimentală.

4. CULTIVARE ÎN CULTURI CELULARE

În culturi celulare virusul herpetic B cultivă uşor şi determină aceleaşi efecte citopatice ca şi virusul herpetic *simplex*.

Celulele renale de iepure, şoarece şi maimuţă s-au dovedit a fi tot atît de sensibile faţă de virus ca şi celulele HeLa, KB, FL şi amniotice umane.

Gavrilov şi colab. (18) au demonstrat însă că fibroblastele de embrion de găină au aceeaşi sensibilitate faţă de virusul herpetic B ca şi iepurele.

Aceeaşi autori arată de asemenea că susceptibilitatea fibroblastelor de embrion de găină este mult mai mare pentru virusul herpetic B decît pentru virusul poliomielitic din vaccinul viu. Susceptibilitatea celulelor faţă de virusul herpetic B şi dinamica multiplicării sale nefiind influenţate de virusul din vaccinul poliomielitic viu, au permis autorilor să considere că pentru controlul vaccinurilor vii antipoliomielitice, utilizarea fibroblastelor de embrion de găină este cea mai recomandată.

a. *Leziuni celulare.* Virusul herpetic B inoculat în culturi celulare determină în mod rapid mărirea de volum a celulelor, dispariţia nucleolilor, marginaţia cromatinei şi apariţia celulelor gigante cu prezenţa de incluzii intranucleare (fig. 127).

Falke şi Richter (16) constată cu ajutorul microcinematografiei că de îndată ce se produce contopirea celulelor, constituind celula gigantă, nucleii se măresc considerabil şi iau o formă rotundă care uneori se poate deforma prin contactul cu ceilalţi nuclei. În acest stadiu al infecţiei, nucleolii au marginile nedelimitate sau chiar dispar. În stadiul următor al infecţiei este netă dispoziţia cromatinei, sub formă de fragmente mici, la periferia membranei nucleare.

Scanned with OKEN Scanner

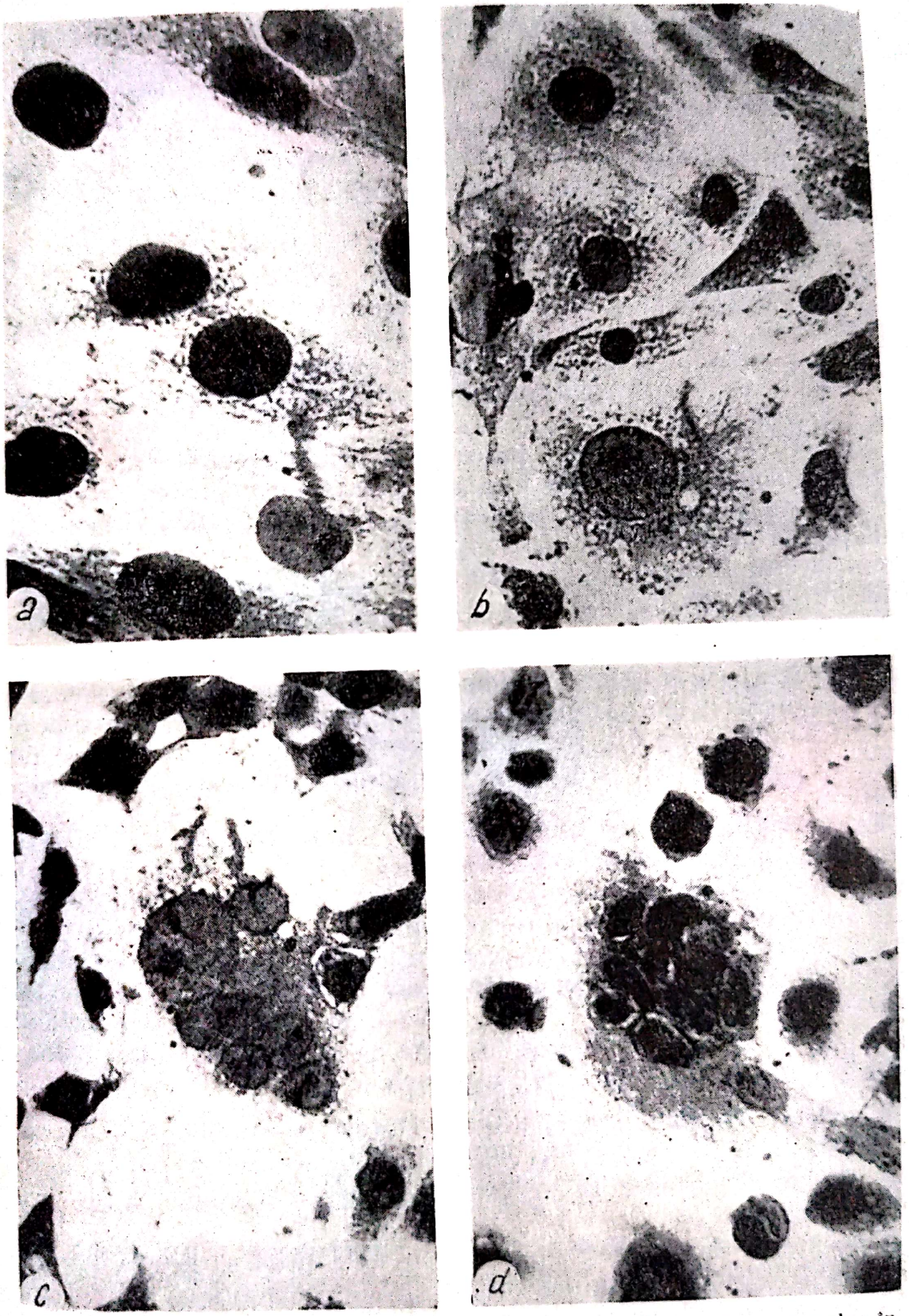


Fig. 127. — Cultură de celule renale de maimuţă. În *a*, celule normale; în *b*, celule la 6 ore de la infectarea lor cu virus herpetic B. Se observă modificarea nucleolilor sau chiar dispariţia lor şi prezenţa de granule dense intranuclear. Vacuolizări ale citoplasmei celulei. În *c* şi *d*, celule la 36 de ore de la infectarea lor cu virus. Se observă în *d* aspect de nucleu retractat şi prezenţa de incluzie nucleară. Reissig şi Melnick, 1955.

Scanned with OKEN Scanner

Falke (16), cercetînd pe celule KB o tulpină de virus herpetic B, izolată de Siegert (45) din culturile de celule renale de maimuță, observă 3 aspecte lezionale caracterizate prin celule gigante mari, celule gigante mici și efect citopatic al celulei unice.

b. *Modul de formare al celulelor gigante.* Falke și Richter (17), studiind microcinematografic fenomenul apariției celulelor gigante în celulele KB infectate cu virus herpetic B, ajung la concluzia că apariția primelor celule gigante are loc la aproximativ 12 ore de la instituirea inoculului; după autori ele se formează prin fuziune celulară, adică printr-o aglomerare de celule cu dispariția treptată a membranei celulare și nicidecum printr-un proces mitotic.

Această contopire celulară începe întotdeauna de la punțile citoplasmice existente sau nou formate, iar nucleii trec de la o celulă la alta datorită mobilității lor active.

Numeroasele punți citoplasmice dintre celule cît și mișcarea granulelor citoplasmice dintr-o celulă în alta, urmată de migrarea nucleilor din celulele izolate în cele gigante, pledează în sensul propagării virusului de la o celulă la alta prin aceste punți. Propagarea virusului de la o celulă la alta prin punțile citoplasmice explică de ce serul anti adăugat mediului de cultură nu influențează cu nimic infecția cu virus herpetic (46) (6) (20).

c. *Incluziile* din infecție cu virus herpetic B sînt ușor evidențiate pe preparatele fixate în prealabil în lichidul Bouin sau Zencker și colorate apoi cu Giemsa, hematoxilină-eosină sau metoda Mann. Ele sînt localizate intranuclear, iar din punct de vedere tinctorial apar bazofile în primele stadii ale infecției, pentru ca în stadiile următoare să devină net eozinofile.

Falke și Richter (16), folosind microcinematografia în contrast de fază, arată că incluziile intranucleare nu pot fi puse în evidență. După autori, structurile izolate din nucleu și refractare la lumină nu ar fi altceva decît aglomerări de corpusculi elementari incompleți, „cristale de virus".

Mauler și Dostal (31) au evidențiat cu ajutorul microscopului electronooptic prezența „cristalelor de virus" în infecția cu virus herpetic B.

Datele aduse de Endo și colab. (12) asupra compoziției incluziilor din nucleul celulelor renale de șoarece infectate cu virus herpetic B au demonstrat însă că ele au caracter dezoxiribonucleic.

d. *Sediul multiplicării virusului.* Datele electronooptice aduse de către Reissig și Melnick (39), cît și cele de imunofluorescență (1) (5) demonstrează că virusul herpetic B se multiplică în același mod ca și virusul herpetic *simplex*.

Folosind metoda directă de punere în evidență a virusului în creierul șoarecilor infectați cu virusul herpetic B, Benda constată că imunofluorescența apare mai întîi în celulele meningelui și apoi în cele ale parenchimului cerebral.

Scanned with OKEN Scanner

B. VARIANTE DE VIRUS

Ca și în infecția cu virus herpetic *simplex*, au fost obținute variante de virus herpetic B.

Falke (14), cultivînd pe celule KB o tulpină proaspăt izolată de virus herpetic B, constată 3 aspecte lezionale ce se mențin constant în pasaje succesive: celule gigante mari, celule gigante mici și efect citopatic al celulei unice. Autorul constată în cursul pasajelor că în tuburile în care s-a inoculat diluția limită de virus apare un singur focar citopatic în care se distinge net prezența unei celule gigante mari. Acest fapt atrage atenția autorului, care face în continuare 18 pasaje pe același suport celular plecînd de la tubul de cultură cu diluția limită de virus și constată că aspectul lezional (celule gigante mari) se menține constant. Această variantă de virus a fost denumită de autor fR *(flache Riesenzellen)*.

Cu ajutorul micromanipulatorului selecționează din această diluție limita de virus celulele rotunde, pe care le inoculează pe celulele KB și obține, în pasajele efectuate, o a doua variantă de virus, rR *(runde Riesenzellen)* ce determină din punct de vedere citopatic două tipuri de leziuni:

a) efect citopatic al celulei unice cu nucleu în diviziune amitotică și prezență de incluzii (celule rotunde sau sferice cu un singur nucleu) și

b) celule gigante mici.

Caracteristic acestor două variante (*fR* și *rR*) este faptul că ele își păstrează caracterele lor prin treceri atît pe celulele KB cît și pe celulele renale umane, de maimuță și amniotice umane (FL), în timp ce pe celulele HeLa, ambele dau numai leziuni de tipul variantei fR.

Dacă din punctul de vedere al aspectului lezional în culturile tisulare mai sus amintite aceste două variante de virus se deosebesc net între ele, în inoculările pe animalele de laborator (iepure, șoarece nou-născut), ambele se comportă identic.

Benda și Cinatl (4) confirmă aceste rezultate. Autorii obțin prin clonări repetate două tipuri de plaje diferite ca mărime; una din ele, varianta de plaje mari, provoacă în culturi un efect citopatic de aspect sincițial, corespunzînd variantei fR a lui Falke, iar cea de-a doua, varianta de plaje mici, provoacă un efect citopatic caracterizat prin celule mici cu aspect rotund, multinucleate, similar variantei rR a lui Falke.

În culturi renale de iepure sau maimuță infectate cu cantități mici din varianta producătoare de plaje mari, autorii obțin, după 12—16 ore de la inoculare, titruri foarte ridicate ale infectivității.

Important este faptul că ambele variante determină la iepure, prin inoculări intradermice, boala herpetică caracteristică, iar din punctul de vedere al comportamentului la diverse temperaturi, cele două variante sînt identice.

Ambele variante sînt neutralizate în acelaşi grad de către serul anti obţinut pe iepure cu virusul B tulpina prototip şi sînt inhibate identic de către 5-iodo-2-dezoxiuridină.

Din datele autorilor reiese în mod clar că cele două variante de plaje se deosebesc foarte puţin din punct de vedere biologic.

C. RELAŢII ANTIGENICE CU ALTE VIRUSURI

Este demonstrat faptul că nu toate tulpinile de virus herpetic B au aceeaşi structură antigenică (37).

Sabin (40), Burnet, Lush şi Jackson (8). Pierce şi colab. (35), Schneweis (44), Falke (15) au stabilit că virusul herpetic B are relaţii antigenice cu virusul herpetic *simplex*.

Serul anti preparat cu virusul herpetic B are capacitatea de a neutraliza virusul herpetic *simplex*, în timp ce serul anti preparat cu virusul herpetic *simplex* nu neutralizează virusul herpetic B sau îl neutralizează numai într-un titru foarte scăzut.

Aceste rezultate demonstrează că între virusurile herpetic *simplex* şi herpetic *simiae* există oarecare diferenţe ale structurilor lor antigenice.

Deşi este demonstrat faptul că în cursul infecţiei cu virus herpetic *simiae* titrul cel mai ridicat de anticorpi neutralizanţi în sînge este faţă de virusul herpetic *simplex*, prezenţa anticorpilor anti herpes *simplex* nu poate însă preveni o infecţie letală cu virus herpetic *simiae*.

Aceeaşi relaţie antigenică a fost demonstrată prin testul de seroneutralizare şi între virusul herpetic B şi cel pseudorabic, însă nu şi faţă de virusul III, virusul varicelei sau alţi membri ai grupului herpetic.

D. INFECŢIA EXPERIMENTALĂ

Virusul herpetic B inoculat pe diverse căi la animale de laborator determină în mod constant fenomene clinice de boală experimentală.

Iepurele este foarte sensibil faţă de acest virus (43). Inoculat intracerebral animalul face de regulă o encefalomielită cu sfîrşit letal.

Pus pe corneea în prealabil scarificată, virusul nu determină apariţia leziunilor de cheratită, fapt ce-l diferenţiază de virusul herpetic *simplex*.

Inoculat intradermic, virusul provoacă o zonă de inflamaţie cu prezenţa unei erupţii veziculare. Necrozele cutanate apar mult mai frecvent decît la infecţia cu virus herpetic *simplex*.

Şoarecele adult este de cele mai multe ori insensibil faţă de virusul herpetic B. Spre deosebire de virusul herpetic *simplex*, care determină boala şi la şoarecii adulţi, virusul herpetic B induce fenomenele de boală numai dacă animalul este sub 3 săptămîni (40).

Scanned with OKEN Scanner

Şoarecii nou-născuţi în vîrstă de 2 zile s-au dovedit a fi mult mai sensibili faţă de virusul inoculat intracerebral sau intraperitoneal.

Cobaiul inoculat intracerebral face în mod constant fenomene de encefalită cu sfîrşit letal (40).

Şobolanul de bumbac are aceeaşi sensibilitate ca şi cobaiul.

Maimuţa este în general sensibilă faţă de virusul herpetic B. S-a arătat de către Sabin şi Wright (43) că maimuţele din America inoculate intracerebral nu fac boala experimentală. La maimuţele aduse din Anglia, Sabin reproduce însă, prin inoculări intracerebrale, o encefalită severă sau letală. El a crezut iniţial că această diferenţă în sensibilitatea maimuţelor faţă de virusul herpetic B s-ar datora unei imunităţi naturale.

Burnet, Lush şi Jackson (8) au constatat însă că unele din maimuţe deşi nu au anticorpi serici nu fac fenomene encefalitice în urma inoculării intracerebrale.

E. EPIDEMIOLOGIE

Maimuţa este singurul rezervor natural de virus ; ea este purtătoare şi transmiţătoare de virus chiar în absenţa semnelor clinice de boală. Prin simpla lor coabitare, maimuţele sănătoase se infectează de la cele bolnave, iar virusul poate fi uşor izolat de la ele, chiar dacă semnele clinice de boală nu sînt evidente (13).

Omul se infectează cel mai frecvent prin muşcătura maimuţei sau prin contactul pielei intacte sau uşor traumatizate cu saliva maimuţei.

În laborator s-au semnalat numeroase cazuri de infecţie cu evoluţie letală la cei ce manipulau culturile celulare preparate din ţesuturi prelevate de la maimuţele infectate spontan cu acest virus.

Uşurinţa contaminării omului în laborator cu virus herpetic B impune respectarea anumitor măsuri de protecţie pentru prevenirea bolii.

Van Hoosier şi Melnick (21) testînd la om prezenţa anticorpilor faţă de virusurile herpetic *simplex* şi herpetic *simiae*, demonstrează, cu ajutorul metodei reducerii plajelor în culturi celulare de rinichi de maimuţă, că toate serurile conţin anticorpi faţă de primul virus şi numai 62% faţă de virusul herpetic *simiae*, şi insistă cu această ocazie asupra posibilităţii infecţiei omului cu virus herpetic B.

F. BOALA NATURALĂ LA MAIMUŢĂ

Odată cu descoperirea virusului s-a considerat că virusul herpetic B există la maimuţe sub o formă latentă.

După Pille (36), mai puţin de 0,1% din cele 6 152 maimuţe din ai căror rinichi s-au preparat culturi tisulare au fost infectate cu virusul herpetic B.

Acelaşi autor, încercînd să izoleze virusul din glandele parotide şi submandibulare de la 152 de maimuţe, nu obţine nici un rezultat pozitiv.

Din datele serologice obţinute de diverşi autori s-a demonstrat însă că infecţia cu virus herpetic B este foarte răspîndită printre maimuţe.

Astfel, în cercetările lor, Sabin (40) şi Burnet, Lush şi Jackson (8) pun în evidenţă prezenţa anticorpilor specifici virusului herpetic B în una din 13 şi respectiv în 9 din 9 maimuţe cercetate.

Investigînd maimuţele *rhesus* şi *cynomolgus*, Hurst (24), Melnick şi Banker (32), Krech şi Lewis (27) semnalează de asemenea prezenţa anticorpilor la aceste animale. Endo şi colab. (13) îi evidenţiază la 44 din cele 196 de maimuţe studiate.

Cercetările făcute de Pille (36) pe 669 de maimuţe (*Macacus rhesus*) între 4 luni şi 5 ani, importate din India, China şi Vietnam, au evidenţiat prezenţa anticorpilor la 17,5% din animale, indicele cel mai ridicat prezentîndu-l animalele în vîrstă de peste 3 ani.

Incidenţa mai ridicată a anticorpilor la maimuţele aduse din China şi Vietnam, faţă de cele din India, a fost interpretată de autor ca fiind determinată de condiţiile diferite de întreţinere şi transport. Într-adevăr, incidenţa anticorpilor pe grupe individuale de maimuţe, aduse şi ţinute izolat, diferă considerabil, anticorpii prezenţi în primele 2 săptămîni în proporţie de 4,2% la maimuţele din India şi de 16,6% la cele din China cresc la 22,2% şi respectiv la 21,5% după o perioadă de o lună de zile de menţinere a lor în vivariumul institutului.

Într-adevăr, Hull şi Nash (22) constată prezenţa anticorpilor numai la 10% din maimuţele capturate din India, faţă de 60—70% după şederea lor în vivarium.

Krech şi Lewis (27), Keeble şi colab. (26) şi Prier şi Goulet (37) constată de asemenea că după 6 săptămîni de vivarium anticorpii cresc de la 75% la 100% dintre animalele studiate.

Cu toate acestea, în literatură nu s-a semnalat decît o singură izbucnire epidemică a bolii printre maimuţele *rhesus* dintr-o crescătorie, aşa încît aspectul clinic al infecţiei primare la acest animal este puţin cunoscut.

Endo şi colab. (13) descriu o infecţie naturală, identică herpesului, la maimuţele asiatice *irus*, *cyclopis* şi *fuscata*, iar Malherbe şi Harwin (30) izolează un virus similar herpesului B (SA_8) din rinichiul maimuţelor *Cercopitecus aethiops* din Africa de Sud.

Datele aduse de Keeble, Christofinis şi Wood (26) cu ocazia unei epidemii au arătat că maimuţa poate prezenta mici vezicule (2—3 mm în diametru) localizate pe suprafaţa dorsală a limbii şi pe marginea

muco-epitelială a buzei, care se transformă apoi în ulcerații urmate în 1—2 săptămîni de vindecare.

După Keeble (25), 2,3% din cele 1 400 de maimuțe *rhesus* între 1—2 ani prezintă atare leziuni herpetice; în general boala trece neobservată, iar prezența anticorpilor în sînge demonstrează că ele au făcut boala.

Maimuța cu leziuni herpetice evidente nu prezintă decît foarte rar modificări ale stării generale sau semne clinice care să ateste o atingere a sistemului nervos central.

La 25% din maimuțe care nu prezintă semne clinice de boală se găsesc totuși leziuni inflamatorii în bulb și protuberanță.

G. BOALA LA OM

Observațiile clinice aduse de numeroși autori (43) (41) (35) (23) (11) au stabilit că infecția cu virus herpetic B la om determină o simptomatologie nervoasă destul de complexă.

După o perioadă ce variază de la cîteva zile pînă la cîteva săptămîni, omul mușcat de maimuță sau infectat în cursul manipulării culturilor tisulare de maimuță prezintă inițial simptome necaracteristice de boală, cu febră, diaree și dureri abdominale, pentru ca apoi să apară fenomene nervoase fie de *encefalită acută* caracterizată prin cefalee, vărsături, comă cu hipertensiune intracraniană, fie de *encefalomielită* în care predomină agitația, delirul, amețelile, atingerea nervilor cranieni (diplopie, nistagmus) și spinali, parestezиile, spasmele mioclonice ale musculaturii trunchiului, paraliziile segmentare ale regiunii capului, gîtului, membrelor superioare și comă, sau chiar de *mielită* tradusă prin pareză și paralizii ale membrelor inferioare, tulburări de micțiune și modificări de reflexe. În această ultimă formă bolnavul este lucid pînă în momentul cînd procesul infecțios ia o evoluție ascendentă cu prinderea centrilor bulbari.

Este de remarcat faptul că în cazul infecției prin mușcătura de maimuță, apariția veziculelor herpetice este o excepție sau, dacă ele apar, trec de obicei neobservate; în mod constant leziunea locală este urmată de o mielită ascendentă (41).

La locul mușcăturii se constată o congestie și o tumefiere a țesutului cu exsudat purulent, limfangită și limfadenită.

În cazul prezentat de Hummeler și colab. (23), deși leziunile veziculare cutanate au fost absente, datele anamnestice (mușcătura de maimuță) și simptomele clinice (febră, semnul Romberg pozitiv, absența reflexelor rotuliene, achileene și abdominale și hemianestezia) au fost suficiente pentru diagnosticul infecției prin virus herpetic *simiae*.

Examenul lichidului cefalorahidian evidențiază de obicei o pleocitoză moderată, glicorahia și albuminorahia fiind în limite normale.

Din observaţiile diverşilor autori (43) (41) (34) (35) (23) reiese că boala are, după cîteva zile sau săptămîni de la debutul simptomatologic, o evoluţie letală.

S-a semnalat însă de către Breen şi colab. (7) un caz la care evoluţia a fost favorabilă însă cu sechele neurologice foarte importante.

H. PROPAGAREA INFECŢIEI

Apariţia mielitei ascendente şi prezenţa simptomelor de partea muşcăturii sînt fapte clinice care arată că migrarea virusului se face de-a lungul nervilor.

Calea de diseminare hematogenă încă nu a putut fi dovedită, însă prezenţa focarelor necrotice în organe (ficat, splină) atestă şi acest mod de propagare a virusului.

În migrarea virusului pe calea nervilor, cilindraxul pare să fie răspunzător. Desigur că posibilitatea migrării între sau în tubii endoneurali în spaţiul perineural sau pe calea sistemului nervos vegetativ, nu poate fi exclusă.

Faptul semnalat de Love şi Jungherr (28) că unul din bolnavi a prezentat iniţial fenomene clinice respiratorii pune însă întrebarea dacă virusul nu se propagă şi pe cale respiratorie.

I. ANATOMIE PATOLOGICĂ

La om leziunile au fost descrise în creier şi măduva spinării. Ele constau din infiltraţii perivasculare cu celulele mononucleare şi uneori necroze ale pereţilor vasculari. Leziuni de necroză ce se observă în unele regiuni dau aspectul unor zone de demielinizare.

În jurul neuronilor se constată cîteva elemente infiltrative constituind fenomenul de staelitoză care, ulterior, ia un aspect de neuronofagie.

Meningele se prezintă hiperemiat şi infiltrat cu celule mononucleare.

Incluzile intranucleare observate în mod curent în herpesul *simplex* nu sînt decît foarte rar evidenţiate în herpesul B, şi aceasta în special în cazurile cînd evoluţia bolii este de scurtă durată.

În splină, noduli limfatici şi suprarenale se găsesc de obicei leziuni necrotice, iar în ficat şi rinichi zone de intumescenţă tulbure.

La maimuţa cu infecţi herpetică naturală Keeble şi colab. (26) constată prezenta leziunilor infiltrative în creier, măduva şi nervi. Ca şi la om incluziile intranucleare sînt greu de pus în evidenţă: ele au fost descrise în neuroni şi în oligodendroglia din jurul procoselor infiltrative perivasculare.

Scanned with OKEN Scanner

În ficat sînt caracteristice zonele de necroză, infiltraţiile periportale cu celule mononucleare şi polimorfonucleare şi prezenţa incluziilor intranucleare în celulele din jurul zonelor de necroză.

La iepure leziunile sînt identice cu cele observate la maimuţe (42). La animalul infectat intradermic, este caracteristică leziunea necrotică locală şi prezenţa proceselor infiltrative în nervi şi sistemul nervos central (propagarea virusului pe cale neurogenă).

J. PROFILAXIE ŞI TRATAMENT

Problema profilaxiei şi tratamentului infecţiei cu virus herpetic *simiae* a fost pusă foarte acut odată cu folosirea culturilor tisulare de maimuţă la prepararea vaccinului antipoliomielitic.

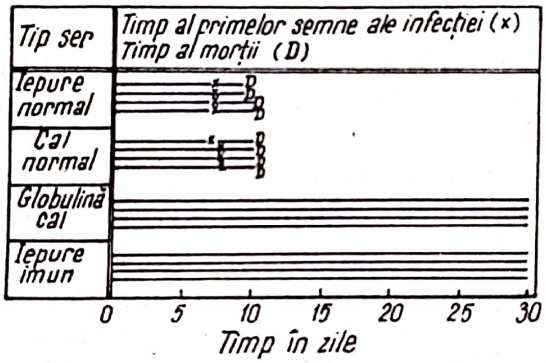


Fig. 128.— Iepuri infectaţi cu virus herpetic B şi trataţi cu gamaglobulină preparată pe cal şi ser anti, omolog. Se constată eficacitatea terapeutică a ambelor produse. Buthala, 1962.

Măsurile de carantină a maimuţelor recent capturate, cît şi reducerea timpului de expunere a lor în crescătorie sau laborator, reduc contaminările lor cu acest virus.

De foarte mare importanţă sînt şi măsurile de protecţie ale personalului care manipulează aceste animale sau culturile celulare (mănuşi, mască, fierberea instrumentelor cu care se lucrează etc.).

În cazul folosirii în practică a unei şarje noi de vaccin antipoliomielitic sînt recomandate testările de virus herpetic B pentru înlăturarea pericolului de infectare.

Gamaglobulinele aplicate în scop profilactic par a avea o oarecare eficacitate. Buthala (9) prepară din serul de cal hiperimunizat o gamaglobulină a cărei eficacitate o testează pe iepure comparativ cu serul homolog hiperimun obţinut pe iepure.

Cu ambele produse autorul obţine rezultate foarte bune, cu condiţia însă ca ele să fie făcute la scurt interval de timp de la instituirea infecţiei şi în cantitate suficientă (fig. 128). Rezultatele cele mai bune au fost obţinute de autor cu serul homolog.

După Nagler şi Klotz (34) prezenţa anticorpilor umorali faţă de virusul herpetic *simplex* nu protejează omul de o infecţie cu virus herpetic B.

Evident că un vaccin bine preparat ar fi foarte necesar în prevenirea infecţiei la om.

Hull şi Nash (22) au demonstrat că virusul inactivat cu formaldehidă determină la iepure, cobai şi maimuţă o creştere a anticorpilor seroneutralizanţi, unii iepuri fiind rezistenţi la inocularea de probă intracerebrală cu virus viu.

Benda (2) prepară pe celule renale de iepure un vaccin formolat după metoda lui Hull, pe care-l experimentează pe iepure; autorul constată că acest vaccin e capabil de a produce o rezistenţă faţă de 100 doze letale de virus administrate intracutanat.

Vaccinul de asemenea protejează iepurele faţă de infecţia de probă respiratorie fapt ce-l determină pe Benda (3) să considere că o vaccinare la om poate preveni o infecţie de laborator pe cale respiratorie.

Mac Leod, Shimada şi Walcroft (29) folosind vaccinul inactivat prin formaldehidă, obţin la iepure şi maimuţă răspunsuri serologice, însă în mod inconstant.

Buthala (10), utilizînd diverse procedee de inactivare a virusului (căldura, razele beta, ketoxanul, glioxalul, formaldehida şi etilenimina) nu obţine vaccinuri eficace, testările efectuate pe iepure nu au determinat nici măcar o creştere în titru a anticorpilor serici.

Aceleaşi rezultate fuseseră de altfel obţinute şi de Sabin (40).

Din punct de vedere experimental vaccinul pare deci a avea o oarecare acţiune, totuşi la om instituirea lui nu determină creşterea anticorpilor serici, aşa încît perspectivele unei vaccinoprofilaxii sînt încă mici.

Lipsa unei terapeutici specifice impune fără îndoială cercetări în acest sens.

Este însă demn de semnalat faptul că sub acţiunea cortizonului în doze mari, Breen şi colab. (7) obţin vindecarea unui caz de infecţie cu virus herpetic B.

K. DIAGNOSTIC

Suspiciunea unei infecţii cu virus herpetic B la om se pune totdeauna cînd o encefalomielită apare fie după muşcătura sau contactul cu maimuţele, fie după manipularea culturilor tisulare de maimuţă.

Scanned with OKEN Scanner

Desigur că diagnosticul de certitudine este pus prin izolarea şi identificarea virusului, prin punerea în evidenţă a anticorpilor serici într-un titru semnificativ şi prin prezenţa leziunilor determinate de virus pe organismele sensibile.

Totuşi diagnosticul nu poate fi pus cît timp bolnavul este în viaţă, datorită faptului că virusul este foarte greu de izolat din sînge, iar anticorpii nu au timp să se formeze, sfîrşitul letal fiind destul de rapid.

În cazul însă cînd boala are o evoluţie peste 10 zile, anticorpii neutralizanţi apar în sînge şi rezultatul serologic are mare importanţă în diagnostic.

Este însă bine ştiut faptul că în cursul bolii apar anticorpi neutralizanţi în sînge atît faţă de virusul homolog, cît şi faţă de virusul herpetic *simplex*, titrurile faţă de acesta din urmă fiind de obicei cele mai ridicate.

Virusul este uşor izolat din creier, măduvă, ganglioni limfatici şi splină (4) (7) (35).

S-a constatat de către Hummeler şi colab. (23) că virusul este mai uşor izolat din fragmentele de organe menţinute în glicerină 50% decît din cele conservate la temperatură scăzută.

BIBLIOGRAFIE

1. Benda, R. — Acta virologica, 1965, **9**, 172.
2. Benda, R. — Cs. Epidem., 1965, **14**, 330.
3. Benda, R. — J. Hyg. Epidem., 1966, **10**, 105.
4. Benda, R., Cinatl J. — Acta virologica, 1966, **10**, 178.
5. Benda, R., Prochazka, O., Cerva, L., Rehn F., Dubanska H., Hronovsky V., Acta virologica, 1966, **10**, 149.
6. Black, F. L., Melnick, J. L. — J. Immunol., 1955, **74**, 236.
7. Breen, G. E., Lamb, S. G., Otaki A. T. — Brit. med. J., 1958, **2**, 22.
8. Burnet, F. M., Lush, D., Jackson, A. V. — Austr. J. exp. Biol., Med., 1939, **17**, 35.
9. Buthala, D. A. — J. infect. Dis., 1962, **111**, 95.
10. Buthala, D. A. — J. infect. Dis., 1962, **111**, 101.
11. Davidson, W. L., Hummeler, K. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 1960, **85**, 970.
12. Endo, M., Aoyama, Y., Kawai, K., Kamimura, T., Sato, K. — J. exp. Med., 1962, **32**, 185.
13. Endo, M., Kamimura, T., Aoyama, Y., Hayashida, T., Kinjo, T., Ono Y., Kotera, S., Suzuki, K., Tajima, Y., Ando, K. — Jap. J. exp. Med., 1960, **30**, 227.
14. Falke, D. — Virology, 1961, **14**, 492.
15. Falke, D. — Naturwiss., 1963, *50*, 507.
16. Falke, D., Richter, J. E. — Arch. ges. Virusforsch., 1961, **11**, 73.
17. Falke, D., Richter, J. E. — Arch. ges. Vurusforsch., 1961, **11**, 86.
18. Gavrilov, V. J., Dodonova, N. V., Romanova M. A., Vopr. virusol., 1961, **4**, 444.
19. Gay, F. P., Holden, M. — J. infect. Dis., 1933, **53**, 287.
20. Hogan, M. D., Roizman, B., Amer. J. Hyg., 1959, **70**, 208.
21. Hoosier, G. L. J. van, Melnick, J. L. — Texas Rep. Biol. Med., 1961, **19**, 376.
22. Hull, R. N., Nash, J. C.— Amer. J. Hyg., 1960, **71**, 15.
23. Hummeler, K., Davidson, W. L., Henle, W., La Bocetta, A. C., Ruch, H. G. — New Engl. J. Med., 1959, **261**, 64.

Scanned with OKEN Scanner

VIRUSURI INCLUSE PROVIZORIU ÎN GRUPUL HERPETIC

VIRUSUL HERPETIC AL MARMOSETEI
SAU
VIRUSUL HERPETIC AL MAIMUȚELOR DIN AMERICA
(PLATYRRHINE HERPES VIRUS)

Holmes şi colab. (43) (42) şi Melnick şi colab. (65), izolează din organele marmosetelor bolnave (*Tamarinus nigricolis* şi *Oedipomidas oedipus*) specia *Saguinus* un virus herpetic nou, foarte patogen pentru animalul gazdă naturală, care determină sindromul descris sub denumirea de hepatita cu incluzii (*inclusion body hepatitis*) (79). El a fost denumit virus herpetic al marmosetei (virus herpetic *tamarinus*).

Prezența anticorpilor la o mare varietate de maimuţe din America îi determină însă pe Holmes şi colab. (44) să propuie termenul de „virus herpetic al maimuţelor din America" (*Platyrrhine* herpes virus).

1. VIRUSUL

Acţiunea eterului. Virusul îşi pierde infectivitatea după 12 ore de menţinere la +4°C în contact cu 20% eter.

Structura corpusculului elementar. Particula virotică este formată dintr-un miez central ce conţine ADN şi are o simetrie icosahedrică cu 162 capsomere (fig. 129).

Structura antigenică. Serul anti preparat pe iepure prin inocularea virusului pe corneea scarificată sau intradermic şi cel preparat pe cobai prin inoculări interperitoneale sau intradermice nu neutralizează virusurile herpetic *simplex*, herpetic B şi pseudorabic.

Aceleaşi rezultate negative au fost observate în reacţia de neutralizare între serurile preparate cu virusurile herpetic simplex, herpetic B şi pseudorabic, faţă de virusul herpetic al marmosetei.

Cercetările întreprinse de Holmes şi colab. (42) au demonstrat însă că deşi nu există relaţii imunologice între acest virus şi ceilalţi membri ai grupului herpetic, poate fi obţinută o coloraţie încrucişată între virusurile marmosetei şi herpes *simplex* cu serul anti cuplat cu fluoresceină.

Cultivarea în oul de găină embrionat. Virusul cultivă în oul de găină embrionat atît prin inoculări pe membrana corioalantoidă cît şi intraamniotic. Pe membrana corioalantoidă virusul se multiplică şi determină apariţia de vezicule, cu incluzii intranucleare caracteristice grupului de

Scanned with OKEN Scanner

virusuri herpetice. Inoculările intraamniotice determină în mod inconstant moartea embrionilor.

Cultivarea în culturi celulare. Virusul cultivă foarte uşor în culturi tisulare şi determină efecte citopatice caracterizate prin prezenţa de celule gigante multinucleate identice cu cele din herpesul *simplex.*

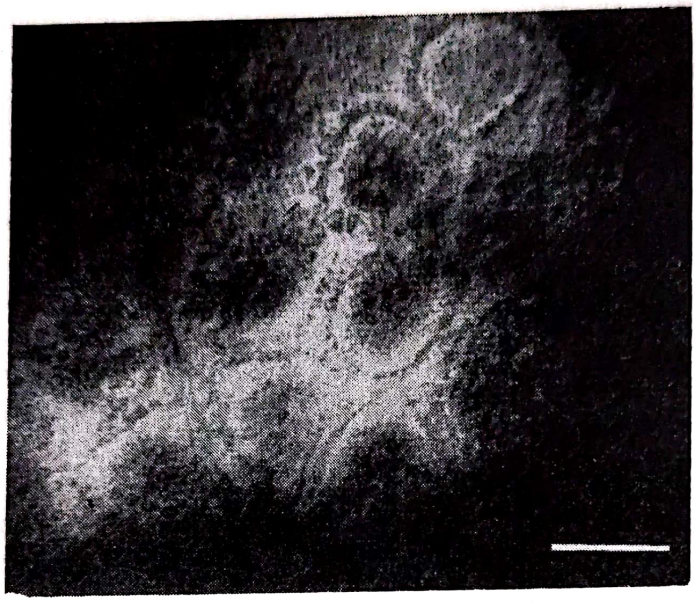


Fig. 129. — Un număr de 12 particule de virus colorate cu fosfotungstat. Melnick şi colab., 1964.

S-a demonstrat de către Holmes şi colab. (42) că cele mai sensibile faţă de acest virus sînt celulele renale de marmoseţă, celulele renale umane şi celulele embrionare umane diploide. Celulele renale de iepure şi Hep-2 sînt mai puţin sensibile; celulele renale de maimuţă *rhesus* s-au dovedit însă a fi cele mai puţin propice pentru cultivarea virusului.

2. INFECŢIA EXPERIMENTALĂ

Marmoseta. Virusul inoculat la marmosetă pe diverse căi (intraperitoneală, subcutanată şi intracerebrală) determină după 3—5 zile fenomene ataxice şi o stare de prostraţie cu cîtva timp înainte de exitus (42).

Inoculat pe cale intradermică produce în 2 zile leziuni hemoragice locale; după 4—7 zile de evoluţie infecţia se generalizează şi animalul sucombă.

Marmoseta infectată pe cale intranazală face după 4—5 zile fenomene de rinită şi pneumonie cu sfîrşit letal.

Histopatologic, la animalele infectate intradermic se găsesc leziuni hemoragice locale şi procese necrotice în corticosuprarenale; la cele infectate intranazal predomină leziunile de pneumonie necrotică.

Scanned with OKEN Scanner

Iepurele. Este sensibil atît la inocularea intracerebrală cît şi la cea intradermică. La 2—3 zile de la infecţia intracerebrală animalul face fenomene de meningo-encefalită cu sfîrşit letal între ziua a 9-a şi a 12-a.

Inocularea intradermică este urmată după 2 zile de ulceraţii cutanate la locul inoculului, care se măresc şi devin maxime în ziua 5—6. La 14 zile iepurele prezintă anticorpi neutralizanţi în titruri destul de ridicate (1/128).

Animalul imun reinoculat pe aceeaşi cale cu virus face leziuni hemoragice foarte mici sau, din contra, leziunile nu apar; titrul anticorpilor neutralizanţi creşte rapid.

Inocularea intraperitoneală nu este însă urmată nici de fenomene clinice de boală şi nici de un răspuns serologic specific.

Şoarecele adult face boala numai la inocularea intracerebrală a virusului.

Şoarecele nou-născut prezintă fenomene de meningoencefalită la 3—5 zile de la inocularea atît intracerebrală cît şi intraperitoneală, iar din punct de vedere lezional, sînt evidente necrozele din parenchimul cerebral şi incluziile din nucleul celulelor nervoase.

Cobaiul reacţionează numai la inocularea intradermică cu aceleaşi fenomene clinice de boală ca şi iepurele, însă cu sfîrşit letal. La inocularea intraperitoneală animalul nu prezintă însă fenomene clinice de boală.

La 2—3 săptămîni de la inocularea intraperitoneală sau intradermică titrul anticorpilor serici este foarte ridicat (1/1024).

3. EPIDEMIOLOGIE

În natură virusul este destul de răspîndit între marmosete; Holmes şi colab. (44) consideră că 1—2 marmosete infectate cu acest virus pot contamina în 2—3 zile 75—100% din animalele indemne.

Cercetînd serologic un număr de 12 specii de maimuţe, autorii evidenţiază prezenţa anticorpilor neutralizanţi în proporţie de 15% la *Saguinus*, de 53% la *Saimiri* şi la *Ateles* şi de 37% la *Cebus albifrons*, restul speciilor investigate (*Cebus apella*, *Lagothrix*, *Aotus*, *Macaca mulata*, *Cercopithecus aethiops*, *Homo sapiens-Rattus rattus* şi *Philander opossum*) fiind lipsite de aceşti anticorpi.

Rezultatele acestor cercetări au demonstrat în plus că prezenţa anticorpilor specifici este mai comună exemplarelor adulte decît la tineret.

Speciile *Saimiri* şi *Cebus albifrons* capturate au titruri de anticorpi mult mai ridicate decît la cele din captivitate.

Scanned with OKEN Scanner

4. BOALA NATURALĂ A MAIMUȚELOR

Rezultatul investigațiilor serologice întreprinse de Holmes și colab. (44) demonstrează că un număr destul de mare de maimuțe din speciile *Saguinus*, *Saimiri*, *Ateles* și *Cebus Albifrons* sînt infectate în natură cu acest virus fără ca ele să facă o boală letală.

Leziunile ulceroase ale limbii observate uneori, identice cu cele din virusul herpetic B, ar fi un indiciu că aceste animale fac totuși boala clinic aparentă.

La animalele infectate natural sînt prezente, din punct de vedere histopatologic, focarele de necroză în organe și în special în ficat (fig.130), splină, capsule suprarenale și intestin subțire, și incluziile intranucleare (fig. 131) din celulele din jurul acestor focare.

VIRUSUL RINOPNEUMONITEI ECVINE

Denumirea de virusul rinopneumonitei ecvine a fost propusă de Crowe și colab. (25) în 1959.

În natură virusul afectează ecvinele.

A fost semnalat în Europa, Africa de Sud și în Statele Unite ale Americii și determină apariția avortului în luna a 8-a — a 10-a de gestație. Foarte rar au fost semnalate la ecvine și fenomene nervoase.

Transmiterea virusului se face probabil pe cale respiratorie.

1. VIRUSUL

Proprietăți fizico-chimice. Virusul rinopneumonitei ecvine își păstrează proprietățile patogene prin congelare la —18°C și este foarte labil sub formă de suspensie la care nu s-a adăugat ser normal.

Formolul în concentrație de 0,35% îl inactivează.

Bracken și Norris (12) descriu în nucleul celulelor infectate prezența de corpusculi elementari cu o dublă membrană în jur, cu o dimensie de 146 mμ și corpusculi elementari mai mici (90 mμ) cu un nucleoid de 40 mμ.

Tajima, Shimizu și Ishizaki (91) constată însă prezența corpusculilor elementari atît în nucleul cît și în citoplasma celulelor, cei intranucleari avînd un diametru de 90 mμ, iar cei intracitoplasmici un diametru de 115 mμ.

În cercetările lor, Arhelger, Darlington și Randall (5) evidențiază un aranjament cristalin al corpusculilor elementari din nucleu.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 130. — Zonă de necroză în ficatul marmosetei. Melnick și colab., 1964.

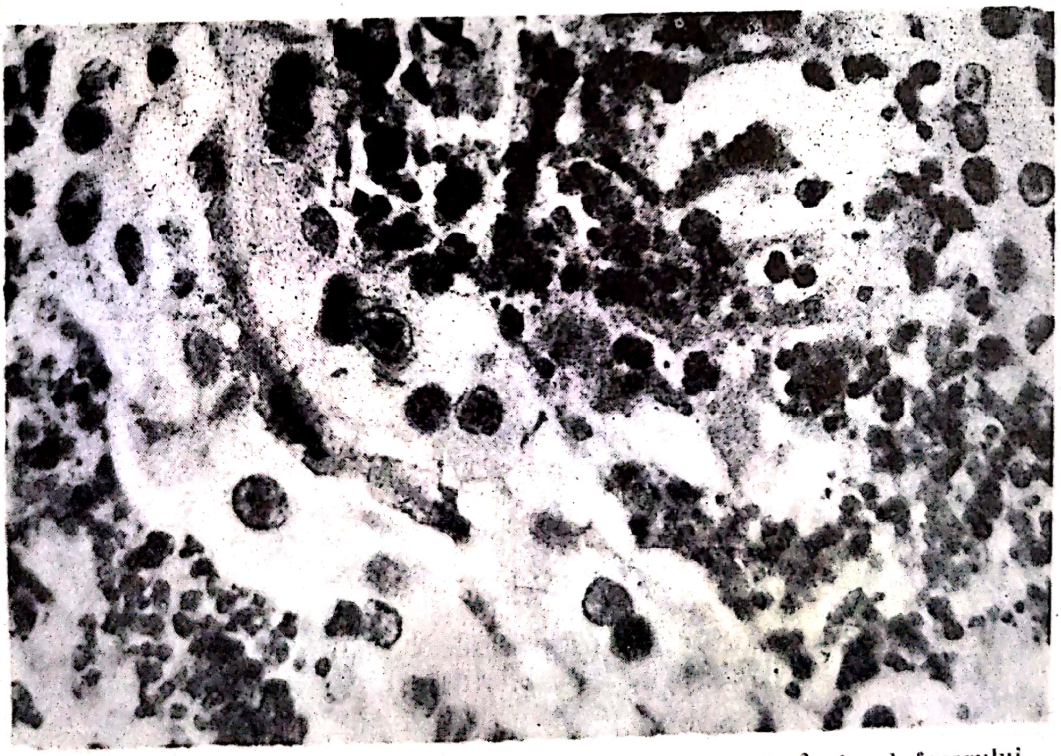


Fig. 131. — Necroză hemoragică în rinichiul marmosetei. În jurul focarului necrotic prezența de celule cu incluzii intranucleare. Melnick și colab., 1964.

Scanned with OKEN Scanner

Virusul rinopneumonitei ecvine este de tip ADN. După Darlington şi Randall (28) el conţine ADN în proporţie de 9,2%.

S-a demonstrat, ca şi la virusul herpetic *simplex*, că incluzia matură nu conţine ADN.

Virusul are proprietate hemaglutinantă. McCollum, Doll şi Bryans (59) au arătat că virusul din ţesuturile de hamsteri infectaţi aglutinează globulele roşii de cal între 4° şi 37°C.

Prin menţinerea la 56°C, virusul îşi pierde proprietatea hemaglutinantă.

Cercetările întreprinse de Semerdjiev (83) au demonstrat faptul că virusul aglutinează atît globulele roşii de cal, cît şi cele de cobai după prealabila lor tratare cu formol.

Cultivare. Virusul rinopneumonitei ecvine cultivă în oul de găină embrionat inoculat intravitelin, intraamniotic şi pe membrana corioalantoidă (31) (73). Pe membrana corioalantoidă virusul determină apariţia de vezicule (pock) asemănătoare celor de herpes *simplex*.

Inoculat pe celule de embrion de cal, celule renale de cal, amniotice umane, oaie, porc şi pisică, ca şi pe celule HeLa, virusul cultivă, determinînd un efect citopatic caracteristic, cu prezenţa de incluzii intranucleare (60) (84).

Pe celule renale de iepure determină, ca şi virusul herpetic, *simplex*, o rotunjire şi balonizare a celulelor cu formarea de sinciţii şi prezenţa de incluzii intranucleare (70).

2. INFECŢIE EXPERIMENTALĂ

Experimental, virusul poate fi transmis la animalele de laborator.

Inoculat intraperitoneal la hamsterul sirian sugar şi adult virusul provoacă leziuni de hepatită letală (3) (30).

Kaschula şi colab. (46) reproduc la şoarecele sugar, prin inoculări intracerebrale, o boală experimentală letală.

La cobăiţele gestante infectate cu virus, Doll şi colab. (30) constată apariţia avortului spontan.

3. ANATOMIE PATOLOGICĂ

Din punct de vedere anatomopatologic, la fetuşii avortaţi sînt prezente în ficat focare necrotice, incluzii intranucleare în celulele hepatice şi epiteliale.

Este însă de semnalat faptul că la iepele care au avortat leziunile anatomopatologice sînt absente.

Scanned with OKEN Scanner

VIRUSUL RINOTRAHEITEI INFECȚIOASE A BOVINELOR

Boala este cunoscută sub numele de „*infectious bovine rinotracheitis*" (IBR).

Rinotraheita bovină infecțioasă a fost semnalată în jumătatea de vest a Statelor Unite, Anglia, Germania și Noua Zeelandă.

Virusul produce uneori la bovidee și determinări vulvo-vaginale („*infectious pustular vulvo-vaginitis*" — IPV) (47), așa încît unii autori (1) denumesc acest virus IBR—IPV.

Determinări de vulvo-vaginită pustuloasă infecțioasă au fost semnalate în partea de răsărit a Statelor Unite, (77) (52) (47) (50), Canada (36), Noua Zeelandă (55) (32), Australia (41) (68), Republica Sud Africană (58) și în diverse țări din Europa (99), (21) (88) (51) (56).

Virusul joacă de asemenea un rol important în etiologia avortului bovin (53) (24) (64) (20), balanopostitei și orhitei (11) (21) (88) (89) (90), epididimitei și vaginitei (58) (57).

Cercetările de laborator efectuate de Gillespine și colab. (35) și McKercher și colab. (63) au demonstrat că între virusurile IBR și IPV nu există nici o deosebire serologică, ele fiind unul și același virus.

Prin teste de imunitate încrucișată, McKercher (62) arată că între tulpinile de virus IBR și IPV izolate în Europa și o tulpină izolată în America nu există deosebiri antigenice.

1. VIRUSUL

Proprietăți fizico-chimice. La temperatura de —70°C și —20°C virusul își păstrează proprietățile patogene timp de 6 și respectiv 2 luni; menținut 15 zile la 5°C, 10 zile la 20°C sau 24 de ore la 37°C, virusul își pierde din proprietățile sale patogene, însă este complet inactivat prin menținere timp de 10 min la 56°C sau 4 min la 65°C (40).

Supus înghețului și dezghețului (—70°C și +37°C) virusul își pierde din titrul său infectant (56).

Virusul IBR este inactivat în 21 min la 56°C, în 10 zile la 37°C și în 50 zile la 22°C (37).

Este sensibil la acțiunea eterului (36) (6) (86) (85); menținut peste noapte în eter 20% virusul își scade cu de 100 ori titrul infectant.

Cloroformul, dezoxicolatul de sodiu (40), acetona și alcoolul (37) au de asemenea acțiune inactivantă asupra virusului.

După Griffin și colab. (37) și Hahnefeld și colab. (40) virusul este labil la pH 4—5 și foarte stabil la pH 6—9.

Scanned with OKEN Scanner

Prin ultracentrifugare s-a calculat de către Tousimis şi colab. (92) că virusul are dimensia cuprinsă între 145 şi 156 mμ, iar electronooptic 136 ± 10,8 mμ.

Knocke şi Liess (49) au demonstrat electronooptic că virusul matur, prezent în citoplasma celulelor infectate, are o dimensie de 130 — 180 mμ şi are un înveliş. Particulele din nucleu (incomplete) formate dintr-un nucleoid şi o membrană în jur au o dimensie de 90 × 50 mμ.

Cercetările întreprinse de Armstrong şi colab. (6), Knock şi Liess 49, Grinyer şi colab. (38), Schulze şi colab. (80). Berry şi colab. (9) au adus date ce atestă similitudinea dintre acest virus şi cel herpetic *simplex* (corpusculi intranucleari cu o singură membrană în jur, cu diametrul de 115 mμ şi corpusculi intracitoplasmici cu 2 membrane în jur, cu diametrul de 150 mμ).

Cruickshank şi Berry (27) constată în purificatele de virus prezenţa particulelor cu un diametru de 950 şi 990Å, a căror capsidă are o simetrie axială 5 : 3 : 2.

Prin imunofluorescenţă, Armstrong şi colab. (6) au ajuns la concluzia că virusul este de tip ADN. De altfel cercetările întreprinse de Stevens şi Groman (87) şi Hahnefeld şi colab. (39), Afshar (1), Persechino şi Orfrei (69) au demonstrat faptul că 5-iodo-2-dezoxiuridina şi 5-fluoro-dezoxiuridina inhibă creşterea virusului în celule.

Virusul este omogen din punct de vedere antigenic (100) (35) (62) şi are relaţii antigenice (fixare a complementului şi difuzie în gel) cu virusul rinopneumonitei ecvine, însă nu şi cu virusul herpetic *simplex* (18) (6).

Cultivare. Cercetările lui Madin şi colab. (54) au arătat că virusul cultivă în culturi celulare de rinichi, testicul, pulmon şi piele de embrion bovin, efectul citopatic cu prezenţa incluziilor intranucleolare fiind evidente la 24—48 de ore de la inoculare.

Virusul cultivă de asemenea în celulele renale şi testiculare la iepure, în celulele renale de bou (19) (82) (67) (92) (6) (29), renale de maimuţă (78), renale de porc (81) (10), în celulele splenice de iepure (6), în celulele de ganglion limfatic bovin (63), în celulele amniotice umane (19) şi în celulele HeLa (17) (67), (6).

În oul de găină embrionat virusul nu cultivă, indiferent de calea de inoculare folosită (47).

2. INFECŢIA EXPERIMENTALĂ

S-au putut reproduce de către Brown şi Bjornson (13) leziuni de rinotraheită cu vulvo-vaginită la vacile infectate experimental. Quin (72) constată la viţeii cu infecţie experimentală numai apariţia unei conjunctivite.

La capra tînără, McKercher (61) obţine boala experimentală caracterizată numai prin febră.

Armstrong şi colab. (6) obţin la iepurele inoculat intradermic şi intratesticular leziuni necrotice locale.

Şoarecele şi cobaiul s-au dovedit a fi rezistenţi la infecţia cu virus, indiferent de calea sa de administrare (47).

3. BOALA ÎN NATURĂ

În natură sînt afectate bovinele.

Virusul determină la acestea o afecţiune acută a tractusului respirator, caracterizată printr-o inflamaţie acută cu exsudat şi necroza mucoasei.

Boala apare însă după o incubaţie de 4—6 zile şi este însoţită de febră, indispoziţie şi uneori diaree hemoragică.

Boala durează 10—14 zile şi are în general o evoluţie letală (75% din cazuri).

Virusul mai determină vulvo-vaginite, balanopostite, epididimite, orhite şi avort.

4. ANATOMIE PATOLOGICĂ

Sînt caracteristice leziunile inflamatorii acute şi procesele necrotice ale mucoaselor, cu incluzii intranucleare în celulele epiteliale, degenerate, de la periferia zonelor necrotice (56).

În mod inconstant, Webster şi Manktelow (97) descriu leziuni în sistemul nervos şi suprarenale.

5. VACCINOPROFILAXIE

S-a arătat de către Schwartz şi colab. (82) că după 40 de treceri în culturi celulare (rinichi bovin), virusul îşi pierde din proprietăţile sale patogene şi determină la bovine o stare de imunitate.

Kendrick şi colab. (48), York şi colab. (101) şi Brown şi Chow (14) folosesc acest vaccin cu bune rezultate în prevenirea bolilor respiratorii la bovine.

Schwartz şi colab. (81), Zuschek şi Chow (98) şi Fastier şi Smith (32) prepară prin treceri pe celule renale de porc şi renale bovine, un vaccin viu foarte eficient la bovine, atît în infecţiile respiratorii, cît şi în cele genitale.

Scanned with OKEN Scanner

VIRUSUL LARINGOTRAHEITEI INFECȚIOASE AVIARE

Virusul laringotraheitei infecțioase aviare este diferit de cel al bronșitei infecțioase a puilor de găină. El este prezent în America de Nord, Australia și Europa.

1. VIRUSUL

Proprietăți fizico-chimice. Virusul este bine conservat prin menținere sub formă congelată. Expus la temperatura de 55°,5C el este inactivat în 10 — 15 min, iar la 60° în 2—3 min.

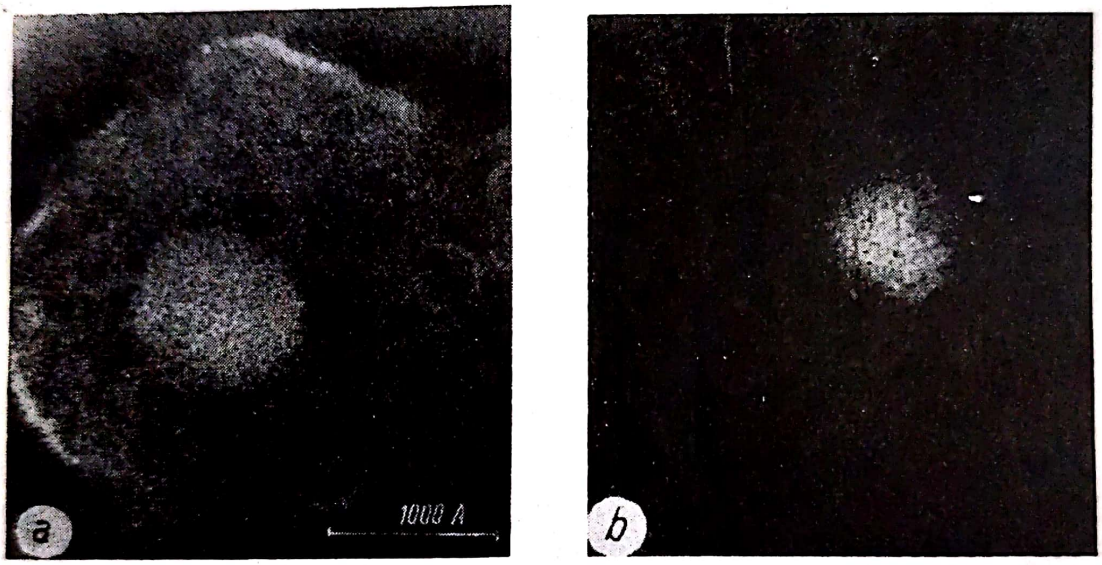


Fig. 132. — Virusul laringotraheitei infecțioase aviare.
a. Particule cu înveliș,
b. Se observă capsida hexagonală cu 5 capsomere aranjate regulat pe muchia unui triunghi echilateral. Cruickshank, Berry și Hay, 1963.

Gibbs (34) stabilește prin filtrări că virusul are o dimensiune de 45 — 48 mμ. Filmer și Hanson (33) constată pe preparatele electronooptice corpusculi elementari cu o dimensie de 64 mμ. Pe secțiuni de membrană corioalantoidă, Watrach (94) evidențiază în nucleul celulelor corpusculi elementari, unii cu o dimensie de 35 mμ, iar alții cu o membrană în jur cu un diametru de 81 — 99 mμ. În citoplasma celulelor, Watrach și colab. (95) au demonstrat cu cîțiva ani înainte prezența corpusculilor cu o dimensie de 150 — 240 mμ, cu un centru opac al cărui diametru este cuprins între 50 și 80 mμ.

Cruickshank și colab. (26) constată că simetria axială a virusului este identică cu aceea a virusurilor din grupul herpetic (fig. 132).

Scanned with OKEN Scanner

Cultivarea în ou de găină embrionat. S-a arătat de către Burnet (15) că virusul laringotraheitei infecţioase aviare cultivă pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat şi determină apariţia fie a unor zone opace, de dimensii mari, cu necroză centrală, fie a unor zone opace mici fără necroză centrală.

Burnet şi Foley (16), inoculînd virusul intraamniotic, obţin leziuni ale embrionului, cu incluzii intranucleare în celulele epiteliului traheal şi bronşic.

Cultivare în culturi tisulare. Atherton şi Anderson (7), Webster (96), Pulsford (71) etc. au stabilit că virusul cultivă în culturi celulare.

Inoculat pe celule renale şi de muşchi de pui de găină în vîrstă de o zi, virusul determină efect citopatic.

În celulele embrionare de găină virusul cultivă şi determină apariţia celulelor gigante cu incluzii intranucleare.

Pe celule HeLa virusul cultivă, însă nu provoacă efect citopatic (96).

2. BOALA ÎN NATURĂ

În natură virusul infectează numai păsările de curte şi fazanii. Ocazional au fost semnalate infecţii la raţe, curcani şi porumbei.

După 2—6 zile de incubaţie apare o traheită hemoragică cu respiraţie greoaie şi uneori conjunctivită hemoragică. Boala durează 2—3 săptămîni şi sfîrşeşte letal în 70% din cazuri.

3. EPIDEMIOLOGIE

Transmiterea virusului se face direct pe cale respiratorie şi indirect prin intermediul omului. Virusul există şi în ouă, aşa încît transmiterea sa poate fi asigurată şi pe această cale. În multe zone, virusul este eliminat de păsări şi boala persistă endemic.

4. ANATOMIE PATOLOGICĂ

În formele severe de boală, leziunile se caracterizează prin prezenţa inflamaţiei hemoragice şi a edemului tractului respirator superior şi uneori chiar ale conjunctivei, cu prezenţa la 12 ore de la infecţie a incluziilor intranucleare în celulele epiteliale.

5. VACCINOPROFILAXIE

Beaudette şi Hunson (8) au folosit ca vaccin virusul viu cu rezultate foarte bune. Mai recent, Cox (23) foloseşte cu aceleaşi rezultate virusul atenuat prin trecerile seriate pe oul de găină embrionat.

Scanned with OKEN Scanner

VIRUSUL III AL IEPURELUI SAU VIRUSUL HERPETIC *CUNICULI* (75) (76)

Există sub formă latentă la iepurii din Statele Unite, Anglia şi Elveţia. Virusul este exacerbat numai după cîteva pasaje oarbe. Odată exaltată virulenţa sa, virusul determină leziuni eritematoase prin inoculări intradermice, orhită şi febră prin inoculări intratesticulare, pericardite prin inoculări intratoracice (66) şi encefalite prin inoculări intracerebrale (74), cu prezenţa de procese inflamatorii şi incluzii intranucleare.

Virusul îşi păstrează proprietăţile patogene timp de aproximativ 24 de zile prin menţinere la glicerină 50% sau peste 16 luni prin menţinere sub formă congelată. La 55°C este inactivat în 10 min, iar la 45°C în 30 min.

Cultivare. Virusul nu cultivă în oul de găină embrionat. Virusul cultivă însă în culturi tisulare de testicul de iepure (4), determinînd incluzii intranucleare.

Ivanovici şi Hyde (45) demonstrează ulterior că virusul determină efect citopatic în culturile celulare obţinute din orice alt ţesut de iepure.

Proprietăţi antigenice. Iepurii infectaţi au în ser atît anticorpi neutralizanţi, cît şi fixatori de complement faţă de virus.

Prezenţa incluziilor intranucleare i-a determinat pe autori să considere acest virus ca făcînd parte din grupul herpetic. Totuşi Cowdry (1930) arată oarecare diferenţe între aspectul incluziilor determinate de virusul III al iepurelui şi cel herpetic.

BIBLIOGRAFIE

1. Afshar, A. — Vet. Bull., 1965, **35**, 735.
2. Afshar, A. — *Studies of some viruses associates with 'nfertility and abortion in Cattle*, Ph. D. thesis, University of Reading.
3. Anderson, K., Goodpasture, E. W. — Amer. J. Path., 1942, **18**, 555.
4. Andrewes, C. H. — Brit. J. exp. Path., 1929, **10**, 188.
5. Arhelger, R. B., Darlington, R. W., Randall, C. C. — Amer. J. Path., 1963, **42**, 703.
6. Armstrong, J. A., Pereira, H. G., Andrewes, C. H. — Virology, 1961, **14**, 276.
7. Atherton, J. G., Anderson, W. — Austr. J. exp. Biol. Med. Sci., 1957, **35**, 335.
8. Beaudette, F. R., Hunson, C. B. — J. Amer. vet. med. Ass., 1933, **82**, 460.
9. Berry, D. M., Cruickshank, J. G., Chu, H. P., Wells, R. J. H. — Virology, 1964, **23**, 403.
10. Bindrich, H. — Arch. exp. vet. Med., 1960, **14**, 656.
11. Bouters, R., Vandeplassche, M., Florent A., Leunen, J., Devcs, A. — Vlaams diergeneesk. Tijdschr., 1960, **29**, 171.
12. Bracken, E. C., Norris, J. L. — Proc. Soc. exp. Biol. Med., 1958, **98**, 747.
13. Brown, A. L., Bjornson, C. B. — Amer. J. vet. Res., 1959, **20**, 985.
14. Brown, W. W., Chow, T. L. — J. Amer. vet. med. Ass., 1959, **134**, 29.

Scanned with OKEN Scanner